

Tesis de Posgrado

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios polares presentes en equinodermos

Roccatagliata, Alejandro Jorge

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Roccatagliata, Alejandro Jorge. (1996). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios polares presentes en equinodermos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2871_Roccatagliata.pdf

Cita tipo Chicago:

Roccatagliata, Alejandro Jorge. "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios polares presentes en equinodermos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2871_Roccatagliata.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS
SECUNDARIOS POLARES PRESENTES EN EQUINODERMOS**

Autor

Alejandro Jorge Roccatagliata

Directora de Tesis

Dra. Marta Silvia Maier

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

-1996-

42

**ABSTRACT: ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF SECONDARY POLAR
METABOLITES FROM ECHINODERMS**

keywords: echinodermata, asteroidea, ophiuroidea, echinoidea, starfish, steroidal saponins, sulfated polyhydroxylated steroids, *Cosmasterias lurida*, *Luidia ludwigi*, *Ophioplocus januarii*, *Ophionotus victoriae*, *Astrofoma agassizii*, *Ophiocoma echinata*, *Encope emarginata*.

The analysis of polar extracts of the starfish *Cosmasterias lurida* Philippi (1858) led us to report the structures of two novel polyhydroxylated xylosides sulfated at C-4' of the xylosyl moiety and four new asterosaponins, two pentaglycosides, Cosmasterosides A and B, and two tetraglycosides, Cosmasterosides C and D, together with two known saponins, the major pentaglycoside Ophidianoside F, previously isolated from *Ophidiaster ophidianus*, *Linckia laevigata* and *Thromidia catalai* and small amounts of the tryglycoside Forbeside H, reported before from *Asterias forbesi*.

Cosmasteroside A contains the same oligosaccharide chain as Ophidianoside F and the (20S)-5 α -cholesta-9(11),24-diene-3 β ,6 α ,20-triol 3 β -sulfated aglycone. Cosmasterosides B, C and D contain the known Thomasterol A aglycone and differ in the number and identity of the monosaccharide components of the carbohydrate chain. Cosmasteroside B contains a novel oligosaccharide chain which differs from the one of Ophidianoside F in the replacement of the quinovose unit attached to the C-6 of the steroidal aglycone by glucose. The tetraglycosides Cosmasterosides C and D are structurally related to Ophidianoside F and Cosmasteroside B respectively, by the loss of the terminal fucose.

The new steroid 5 α -cholestane-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 26-sulfate has been isolated from the starfish *Luidia ludwigi scotti* Bell (1917). This compound co-occurs with two known asterosaponins, Acanthaglycosides B and C, and two polyhydroxysteroids previously isolated from the starfish *Myxoderma platyacanthum*.

One new and three known sulfated steroidal polyols have been isolated from the ophiuroid *Ophioplocus januarii* (Lütken, 1856). The four compounds possess 4 α ,11 β -dihydroxy-3 α ,21-disulfoxy substituents and the A/B *cis* ring junction but differ in the side-chain. The new compound has been characterized as (22E)-5 β -24-norcholest-22-ene-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol 3,21-disulfate. The four compounds were tested for their inhibitory effect on the replication of three RNA and one DNA viruses. All compounds showed no cytotoxic effects.

We have also isolated from the antarctic ophiuroid *Ophionotus victoriae* (Bell, 1902) a mixture of two new sulfated polyhydroxysteroids as well as two known compounds.

From The tropical ophiuroid *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816) we isolated two polyhydroxylated sulfated steroids 5 β -colest-3 α ,4 α ,11 β ,12 β ,21-pentol 3,21-disulfate and 5 β -colest-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetraol-3,21 disulfate, previously isolated from *Ophioderma longicaudum* and *Ophiocoma dentata* respectively, and a sulfated alkene.

The ophiuroid *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875) contained three new steroidal sulfates accompanied by two known compounds, previously isolated from the ophiuroid *Ophiosparte gigas*. The new compounds contain a terminal isopropenyl group in the side chain not previously reported in sulfated polyhydroxysteroids isolated from ophiuroids.

RESUMEN: AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS POLARES PRESENTES EN EQUINODERMOS

palabras clave: equinodermos, asteroideos, ofiuros, estrella de mar, saponinas esteroidales, esteroides polihidroxilados, *Cosmasterias lurida*, *Ophioplocus januarii*, *Ophionotus victoriae*, *Astrotoma agassizii*, *Ophiocoma echinata*, *Encope emarginata*

A partir del extracto polar de la estrella *Cosmasterias lurida* (Philippi, 1858) se aislaron y caracterizaron dos glicósidos esteroidales (Luridósidos A y B) y cuatro asterosaponinas (Cosmasterósidos A, B, C, y D), todos ellos de estructura novedosa. Se aislaron también el Pycnopodiósido C, Ophidianósido F y Forbésido H reportados con anterioridad en *Pycnopodia helianthoides*, *Ophidiaster ophidianus* y *Asterias forbesi*, respectivamente.

El Cosmasterósido A contiene la misma cadena de oligosacárido que el Ophidianósido F con la aglicona (20S)-5 α -colest-9(11),24-dieno-3 β ,6 α ,20-triol 3 β -sulfato. Los Cosmasterósidos B, C y D contienen Thomasterol A como aglicona y difieren en el número e identidad de los monosacáridos de la cadena de azúcares. El Cosmasterósido B contiene una cadena de oligosacáridos novedosa que difiere de la del Ophidianósido F en el reemplazo de la unidad de quinovosa unida a C-6 de la aglicona por glucosa. Los tetrasacáridos Cosmasterósidos C y D están relacionados con el Cosmasterósido B y el Ophidianósido F respectivamente por la pérdida de la fucosa terminal.

Del asteroideo *Luidia ludwigi scotti* Bell (1917) se aislaron dos asterosaponinas, los Acanthaglicósidos B y C aislados previamente de la estrella *Acanthaster planci* y tres esteroides polihidroxilados. Dos de ellos, 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β ,26-hexaol y 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 15-sulfato, fueron previamente aislados de las estrellas *Myxoderma platyacanthum* y *Luidia maculata* respectivamente y 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 26-sulfato resultó novedoso.

La presencia de una función hidroxilo en C-26 es común en esteroides polihidroxilados aislados de estrellas. Sin embargo, un grupo sulfato en esa posición es muy poco usual.

Los cuatro esteroides polares aislados de *Ophioplocus januarii* (Lütken 1856) presentan grupos sulfato en C-3 α y C-21, los anillos A/B fusionados en *cis*, y grupos hidroxilos en los carbonos C-4 α y C-11 β . El esteroide 24-norcolest-(22E)-5 β -22-en-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetraol 3,21-disulfato resultó novedoso. Los otros tres esteroides fueron aislados previamente de los ofiuros *Ophiocoma dentata*, *Ophiarthrum elegans* y *Ophiarachna incrassata*.

Se estudió la actividad antiviral de los compuestos aislados de *Ophioplocus januarii* contra cuatro virus patógenos en humanos: virus del Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus Junin (JV), virus sincitial respiratorio (RSV) y virus del polio (PV).

A partir del ofiuro antártico *Ophionotus victoriae* (Bell, 1902) se aislaron cuatro esteroides sulfatados, resultando dos de ellos novedosos.

El estudio del ofiuro *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816) permitió aislar dos esteroides polihidroxiados sulfatados 5β -colest- $3\alpha,4\alpha,11\beta,12\beta,21$ -pentol-3,21-disulfato y 5β -colest- $3\alpha,4\alpha,11\beta,21$ -tetraol-3,21-disulfato aislados previamente de *Ophioderma longicaudum* y *Ophiocoma dentata* respectivamente y un alqueno sulfatado de estructura novedosa.

El extracto polar del ofiuro antártico *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875) permitió aislar 5 esteroides polihidroxiados sulfatados. La presencia del grupo sulfato en C-2 es una característica poco común en los esteroides polares aislados de ofiuros. Además, los compuestos novedosos presentan un grupo isoprenilo en la cadena lateral y constituyen los primeros ejemplos de esta cadena en ofiuros. Los dos compuestos conocidos fueron aislados previamente del ofiuro antártico *Ophiosparte gigas*.

A las chicas

Stella Maris, mi esposa

Agostina Belén, mi pequeña hija.

*Agradezco sinceramente a la
Dra. Marta S. Maier, directora de esta tesis,
por su apoyo y guía permanente
y su invaluable afecto.*

*Mi agradecimiento a la Dra. Alicia M. Seldes
por su interés en mi formación científica,
su amistad y su constante colaboración.*

Quiero agradecer a las siguientes personas e Instituciones, cuya ayuda fue muy importante para este trabajo:

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por las determinaciones instrumentales realizadas.

Al Dr. Jorge A. Palermo por los espectros de RMN e invalorable consejos sobre técnicas de RMN-2D.

Al Sr. Jorge A. Aznárez y al Dr. Gerardo Caballero por los espectros de masa y CGL-EM y al Sr. Carlos G. Arabahety por los espectros FAB.

Al Dr. Sven Zea (Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia) por la recolección y clasificación de *Ophiocoma echinata*.

Al Dr. Alejandro Tablado (Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia") por la clasificación de todos los otros equinodermos de este trabajo.

A la Lic. María Luz Piris (Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Chubut) por la recolección de la estrella *Cosmasterias lurida*.

Al Dr. Enrique Morsán (Instituto de Biología Marina y Pesquera "Almirante Storni", San Antonio Oeste, Río Negro), por su invalorable colaboración en la recolección de *Luidia ludwigi* y *Ophioplocus januarii*.

Al Lic. Javier Calcagno (Instituto Antártico Argentino) y al Dr. Daniel Nahabedian (Departamento de Biología, FCEN, UBA) por la recolección de *Astrotoma Agassizii*.

A la Dra. Katrin Iken (Alfred Wegener Institut, Bundesrepublik Deutschland) por la recolección de *Ophionotus victoriae*.

Al Dr. L. Pannell (NIDDK, NIH, Bethesda, MD, USA) por los espectros FAB de los Luridósidos A y B.

A la Dra. María Iorizzi y el Dr. Luigi Minale (Dpto. de Química de las Sustancias Naturales, Universidad de Nápoles) por los espectros RMN ^1H (500 MHz) y FAB $^-$ de las asterosaponinas de *Cosmasterias lurida*.

A la Dra. Elsa Damonte y al Dr. Carlos Pujol por los ensayos de actividad antiviral de los esteroides sulfatados aislados de *Ophioplocus januarii*.

Al Dr. Carlos Stortz por los consejos sobre hidrólisis y derivatización de los productos de hidrólisis de glicósidos.

Al Dr. Marcelo R. Cases por los patrones de D-glucosa, D-xilosa y L-fucosa y por los reactivos utilizados para preparar los alditoles diastereoméricos.

A la Srta Marina Pérez y el Sr. Alejandro Leidi por su entusiasmo y colaboración en parte del trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Gabriela Cabrera, Dr. Jorge Palermo, Dr. Sergio Giacobello, Lic. Enrique Hughes, Lic. Cecilia D'Alessandro, Lic. Mariana Gallo, Lic. Laura Hernández Franco, Srta. María Florencia Rodríguez Brasco y Srta. Julieta Comin por la amistad, ayuda en todo momento y por los gratos momentos compartidos a lo largo de estos años.

A los compañeros del Departamento de Química Orgánica por su colaboración permanente y cordialidad.

Al personal no docente del Departamento, en especial al Sr. Eduardo López, por su ayuda y disposición constante.

A mi esposa Stella Maris por las figuras de los organismos estudiados y sobre todo por su cariño y apoyo durante estos años.

ÍNDICE

	pág.
Introducción	1
<i>Phylum Echinodermata</i>	3
Objetivos	9
1 <i>Phylum Echinodermata - clase Asteroidea</i>	10
1.1 Asterosaponinas aisladas de <i>Cosmasterias lurida</i> (Philippi 1858).	28
1.2 Identificación de azúcares enantioméricos como sus 1-amino- 1-desoxialditoles diastereoméricos.	55
1.3 Glicósidos esteroidales aislados de <i>Cosmasterias lurida</i> (Philippi 1858).	59
1.4 Asterosaponinas y esteroides polihidroxilados de <i>Luidia ludwigi scotti</i> Bell 1917	68
1.5 Esteroles de <i>Luidia ludwigi scotti</i> Bell 1917	85
2 <i>Phylum Echinodermata - clase Echinoidea</i>	89
2.1 Esteroles de <i>Encope emarginata</i> (Leske, 1778)	89
3 <i>Phylum Echinodermata - clase Ophiuroidea</i>	94
3.1 Esteroides polihidroxilados sulfatados de <i>Ophioplocus januarii</i> (Lütken, 1856)	97
3.2 Esteroides polihidroxilados sulfatados de <i>Astrotoma agassizii</i> (Lyman, 1875)	111
3.3 Esteroides polihidroxilados sulfatados de <i>Ophionotus victoriae</i> (Bell, 1902)	122
3.4 Esteroides polihidroxilados sulfatados y alqueno sulfatado de <i>Ophiocoma echinata</i>	128

Parte experimental

Instrumentos y métodos empleados 140

Datos espectroscópicos 150

Citas bibliográficas 163

Resumen 181

Lista de símbolos y abreviaturas utilizados

- μg microgramo
- μl microlitro
- ABX sistema ABX
- Ac acetilo
- $\text{Ac}_2\text{O/Py}$ anhídrido acético/piridina
- AcOEt acetato de etilo
- BuOH butanol
- CC cromatografía en columna
- ccd cromatografía en capa delgada
- CGL cromatografía gas-líquido
- CGL-EM cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa
- CLAR cromatografía líquida de alta resolución
- c cuarteto
- d doblete
- d.a. doblete ancho
- d.d. doble doblete
- d.d.a. doble doblete ancho
- d.i. diámetro interno
- EM espectrometría de masa
- EM/EM espectrometría de masa tandem

- Et etilo
- Et₂O éter etílico
- EtOH etanol
- eV electrón volt
- ESP/EM⁺ espectrometría de masa con ionización por electrospray
- FAB⁺ espectrometría de masa con ionización por bombardeo con átomos rápidos
- FAB⁺ espectrometría de masa con ionización por bombardeo con átomos rápidos, operando en modo de iones positivos
- FAB⁻ espectrometría de masa con ionización por bombardeo con átomos rápidos, operando en modo de iones negativos
- COSY⁺ espectroscopía de correlación
- NOESY⁺ espectroscopía por efecto nuclear Overhauser
- DEPT⁺ incremento libre de distorsión por transferencia de polarización.
- fuc fucosa
- glc glucosa
- h hombro
- Hz hertz
- IR infrarrojo
- J constante de acoplamiento
- m multiplete
- m/z relación masa/carga
- Me metilo

- MeOH metanol
- MHz megahertz
- OMe metoxilo
- ppm parte por millón
- qui quinovosa
- Rf relación frontal
- RMN-¹³C resonancia magnética nuclear de carbono-13
- RMN-¹H resonancia magnética nuclear de protón
- s singulete
- s.a. singulete ancho
- s.s. solución saturada
- t triplete
- t.a. triplete ancho
- tr tiempo de retención
- trr tiempo de retención relativo
- UV ultravioleta
- xil xilosa

*Aclaración: Al no existir aún una abreviatura reconocida en castellano se optó por la terminología inglesa



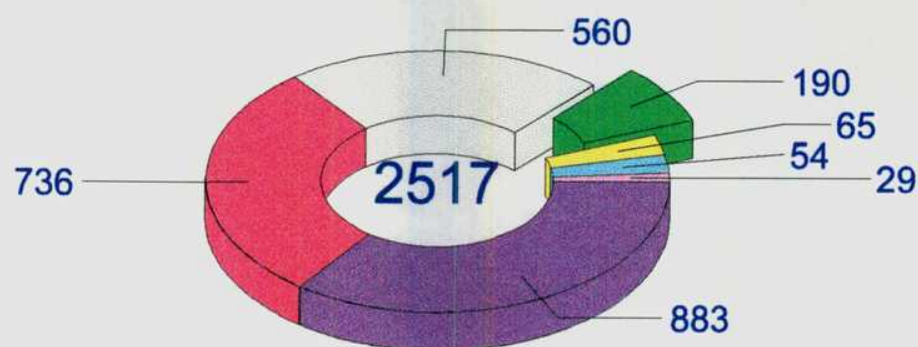
Introducción

Los productos naturales marinos, metabolitos secundarios producidos por organismos que viven en el mar, han recibido creciente atención de químicos y farmacólogos durante las últimas dos décadas. Los organismos marinos constituyen una fuente de nuevas moléculas orgánicas así como de puntos de partida para el desarrollo de nuevos análogos y estrategias sintéticas.

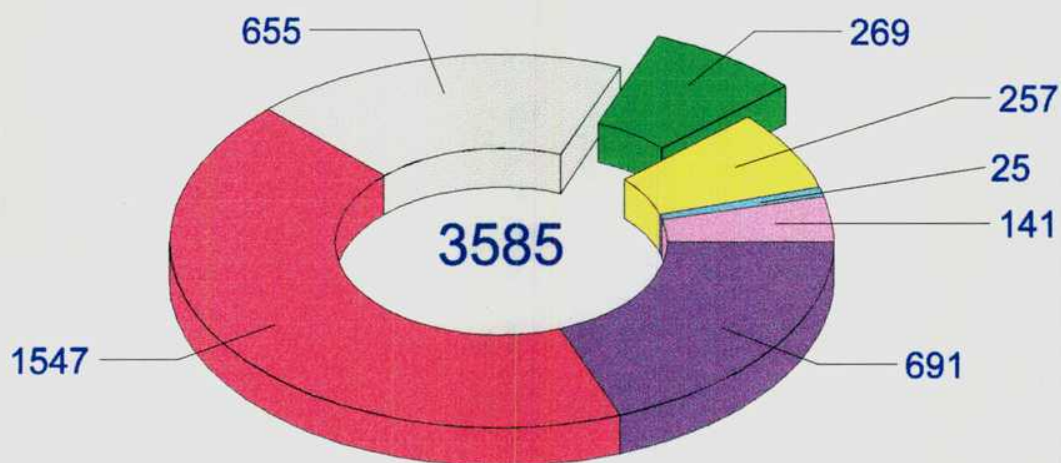
En la década comprendida entre 1977 y 1987 fueron informados aproximadamente 2500 metabolitos nuevos de una gran variedad de organismos marinos, desde microbios procariontes hasta peces vertebrados. Un análisis de filiación de estos compuestos (**fig. 1**) muestra que en su mayoría (94%), pertenecen a cuatro grupos: macroalgas, celenterados, equinodermos y esponjas. Esto refleja, en parte, la abundancia y facilidad de recolección de estos organismos.

Desde 1987 hasta el presente, los mismos cuatro grupos siguen dominantes (88%) pero sus porcentajes relativos se han modificado. La contribución de las macroalgas decreció, mientras que las de las esponjas y los equinodermos han crecido. El aumento en el interés por las esponjas se explica, en parte debido a que estos organismos muestran mayor diversidad biosintética que cualquier otro grupo de invertebrados marinos. Por otra parte, si bien el porcentaje correspondiente a ascidias y microbios continúa siendo modesto, hay un creciente interés en estos grupos.

Es importante remarcar que el número de compuestos informados anualmente se incrementa constantemente (2517 compuestos novedosos en el período '77 a '87 frente a 3585 en los cinco años posteriores, '88 al '93), indicando que los organismos marinos continuarán siendo una fuente de nuevas drogas y seguramente harán grandes contribuciones al desarrollo de fármacos en la próxima década.



'77 a '87



'88 a '93

Fig. 1 - Metabolitos secundarios aislados de invertebrados marinos. Los números indican la cantidad de compuestos novedosos informados en cada período.



PHYLUM ECHINODERMATA

El *phylum Echinodermata* comprende 6000 especies vivientes distribuidas en todos los océanos desde los trópicos hasta la Antártida. Se divide en 5 clases: *Crinoidea*, (lirios de mar); *Holothuroidea*, (pepinos de mar u holoturias); *Echinoidea*, (erizos de mar y dólares de arena); *Asteroidea*, (estrellas de mar) y *Ophiuroidea*, (ofiuros) (**fig. 2**).

El *phylum Echinodermata* es uno de los mejor caracterizados y más curiosos del reino animal. Los equinodermos son fácilmente reconocidos por su pronunciada simetría radial, con casi siempre cinco brazos (o algún múltiplo de cinco) alrededor de un disco central y carentes de una parte anterior o posterior definida. Los equinodermos se diferencian de otros *phylum* radiales (*Cnidaria* y *Ctenophora*) por su mayor grado de organización. Son animales de tamaño considerable, no microscópicos y su superficie en general no es suave sino cubierta de proyecciones calcáreas (del griego *echino* espinoso, *derma* piel). Los equinodermos son celomados no coloniales con parte del celoma (denominado hidrocele) convertido en un sistema de vasos que contienen agua, del que parten ramas tentaculares (pies ambulacrales). El hidrocele es un sistema orgánico polivalente capaz de solucionar las necesidades respiratorias, locomotoras, nutritivas y de percepción sensorial. Los equinodermos son animales exclusivamente marinos y están entre los elementos más abundantes de la fauna del fondo marino.

Los pepinos y estrellas de mar contienen saponinas. Éstas son moléculas complejas, solubles en agua, compuestas de una cadena de hidratos de carbono unida a una aglicona esteroideal (estrellas de mar) o triterpenoidal (pepinos de mar) (**fig. 3**). Las saponinas han sido aisladas de un gran número de plantas terrestres¹, pero en el

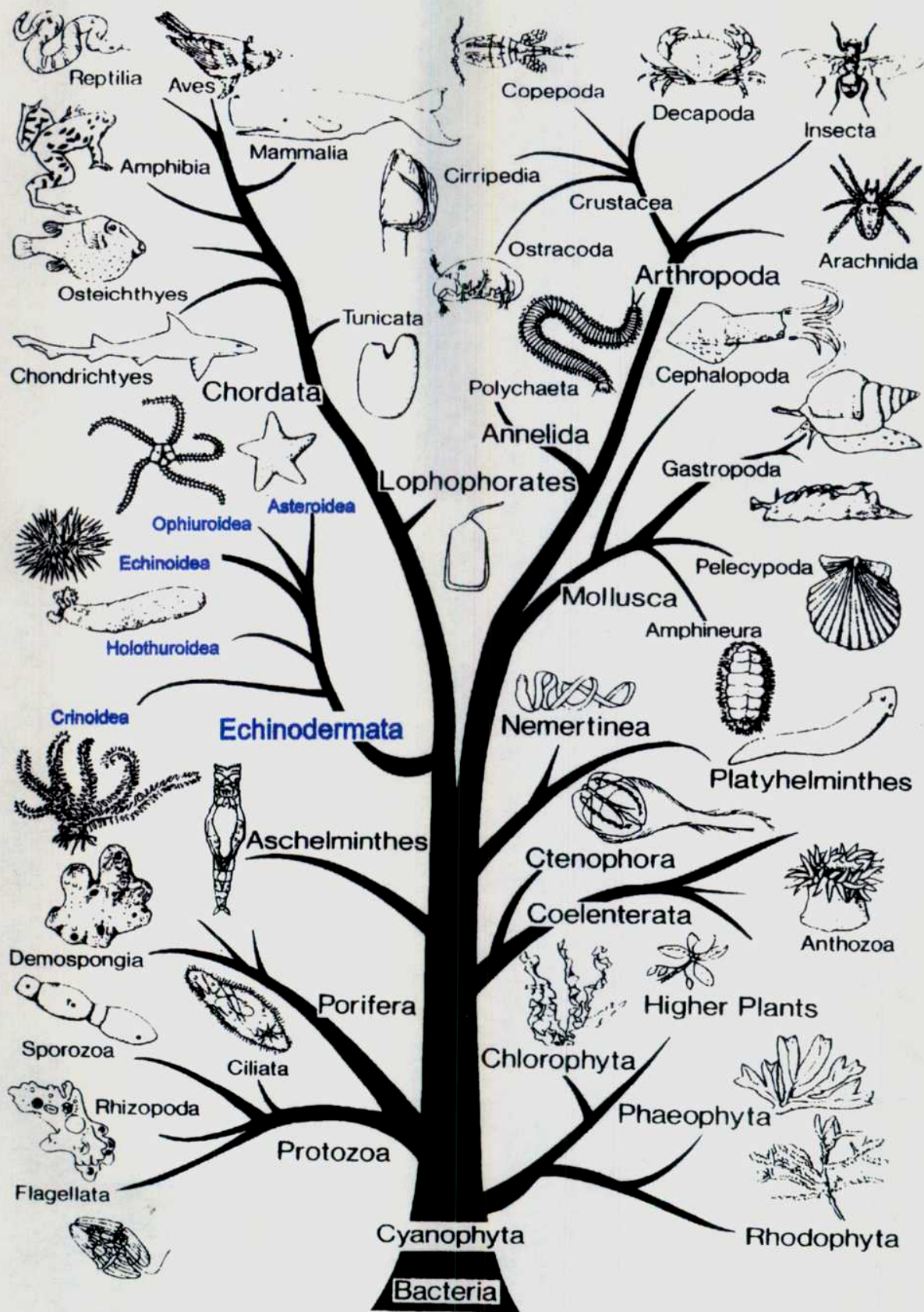


Fig. 2 - Arbol filogenético

reino animal son poco comunes. Se encuentran en pepinos y estrellas de mar², aunque se han aislado rara vez saponinas de corales blandos (alcionarias)³, gorgonias⁴⁻⁶, esponjas⁷⁻¹¹ y peces actuando en este caso como un potente repulsor de tiburones¹².

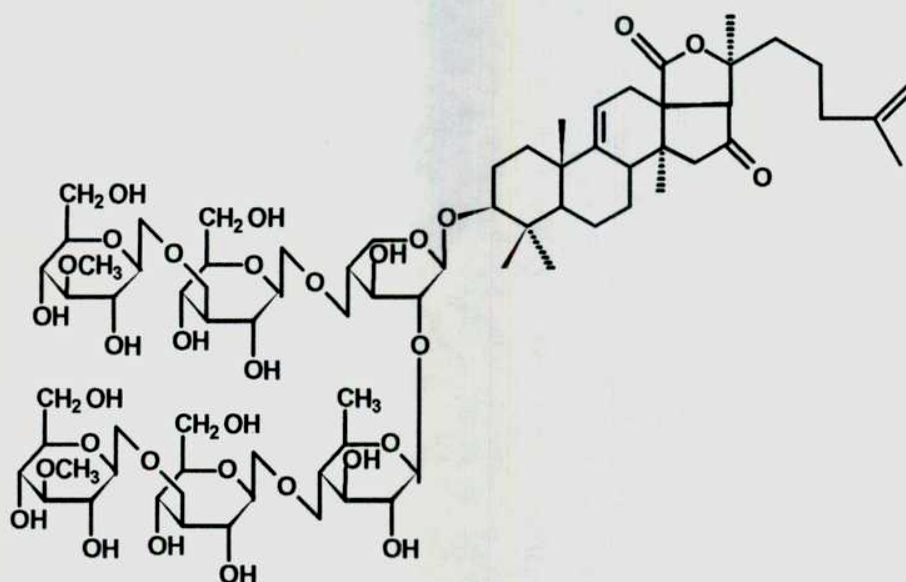


Fig. 3 - Holotoxina A aislada del pepino de mar *Stichopus japonicus*¹³

En cuanto a la relación filogenética entre las distintas clases de equinodermos existen dos teorías. Según Hyman¹⁴, estrellas y pepinos están relacionados en virtud de similitudes en sus tipos de larvas. Lo mismo vale para erizos y ofiuros. Por otro lado, Fell y Pawson¹⁵ basándose en el estudio de fósiles de equinodermos concluyen que estrellas y ofiuros son más “ceranos” de igual manera que pepinos y erizos.

Las evidencias químicas están a favor de la primera teoría. La presencia de saponinas tanto en holoturias como en asteroideos sugiere la posibilidad que los pepinos de mar y las estrellas estén relacionados filogenéticamente. En estrellas y pepinos predominan esteroides Δ^7 probablemente por la presencia de saponinas

hemolíticas, mientras que las otras tres clases de equinodermos contienen esteroides Δ^5 . La hemólisis es debida a la abstracción de colesterol de membrana por las saponinas. Las saponinas muestran mucha menor afinidad por esteroides Δ^7 y en consecuencia estrellas y pepinos serían inmunes a sus propias saponinas. Parece razonable pensar que la presencia de esteroides Δ^7 en estos organismos resulta de una adaptación a sus propias citotoxinas. Además en erizos y ofiuros se han encontrado pigmentos naftoquinónicos, mientras que la coloración de estrellas y pepinos es fundamentalmente debida a carotenoides. Sin embargo, y a favor de la segunda teoría resulta la presencia de metabolitos secundarios esteroidales tanto en estrellas como en ofiuros mientras que los aislados de pepinos de mar son triterpenoidales.

Los ofiuros han recibido poca atención de los químicos en comparación con otros equinodermos. A partir de extractos de ofiuros se han aislado esteroides sulfatados polihidroxilados y sólo en un caso¹⁶ dos esteroides polihidroxilados glicosidados.

Los crinoideos y equinoideos no contienen esteroides sulfatados ni glicósidos esteroidales. Sin embargo se han aislado de estos organismos pigmentos quinónicos¹⁷ (**fig. 4**). Estos pigmentos son conocidos en microorganismos y plantas pero en el reino animal sólo se los ha encontrado en insectos y equinodermos. Estos pigmentos quinónicos ya eran biosintetizados hace algunos millones de años dado que fueron encontrados en un crinoideo del jurásico (*Apiocrinus*)¹⁸.

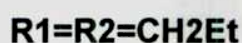
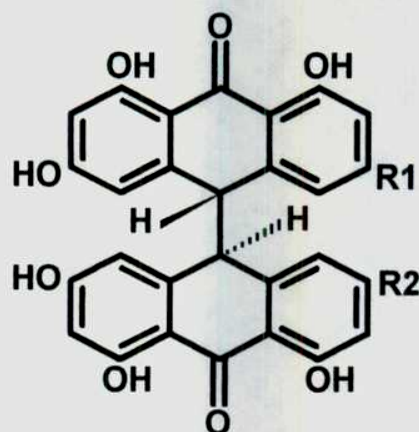


Fig. 4 - Biantronas del crinoideo australiano *Lamprometra palmata gyges*.

Recientemente se aislaron fucanos sulfatados de pepinos y erizos de mar¹⁹.

Los fucanos sulfatados aislados de algas pardas poseen una estructura con preponderancia de uniones en posición 3 y sulfatación en posición O-4 aunque carecen de una estructura repetitiva regular.

Los fucanos sulfatados aislados de equinodermos¹⁹ (pepinos de mar y erizos) tienen como unidad repetitiva un tetrasacárido compuesto por unidades de 1→3-α-L-fucopiranososa sustituida por grupos sulfato en posiciones 2 y 4. Por ejemplo, el fucano aislado del erizo *Lytechinus variegatus* (**fig. 5**) tiene una estructura [3-α-L-Fucp-2(OSO₃⁻)-1→3-α-L-Fucp-4(OSO₃⁻)-1→3-α-L-Fucp-2,4(OSO₃⁻)-1→3-α-L-Fucp-2(OSO₃⁻)-1]_n

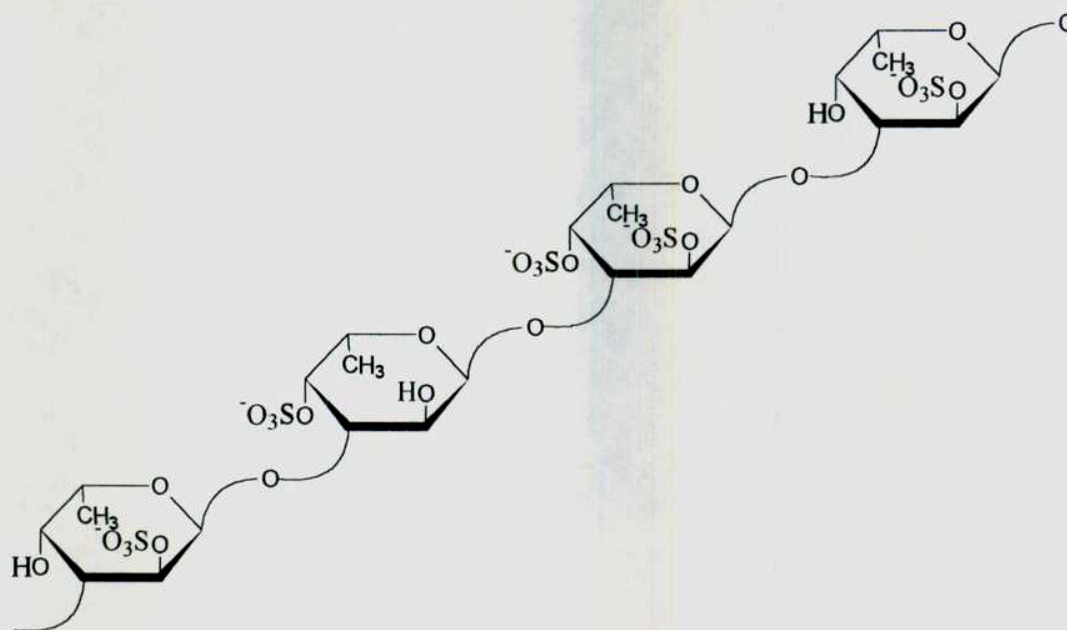


Fig. 5 - Fucano sulfatado aislado de *Lytechinus variegatus*

mientras que otro fucano aislado del pepino de mar *Ludwigothurea grisea* (**fig. 6**) tiene una estructura $[3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-2,4(OSO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-1}\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-2(OSO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-2(OSO}_3^-)\text{-1}]_n$.

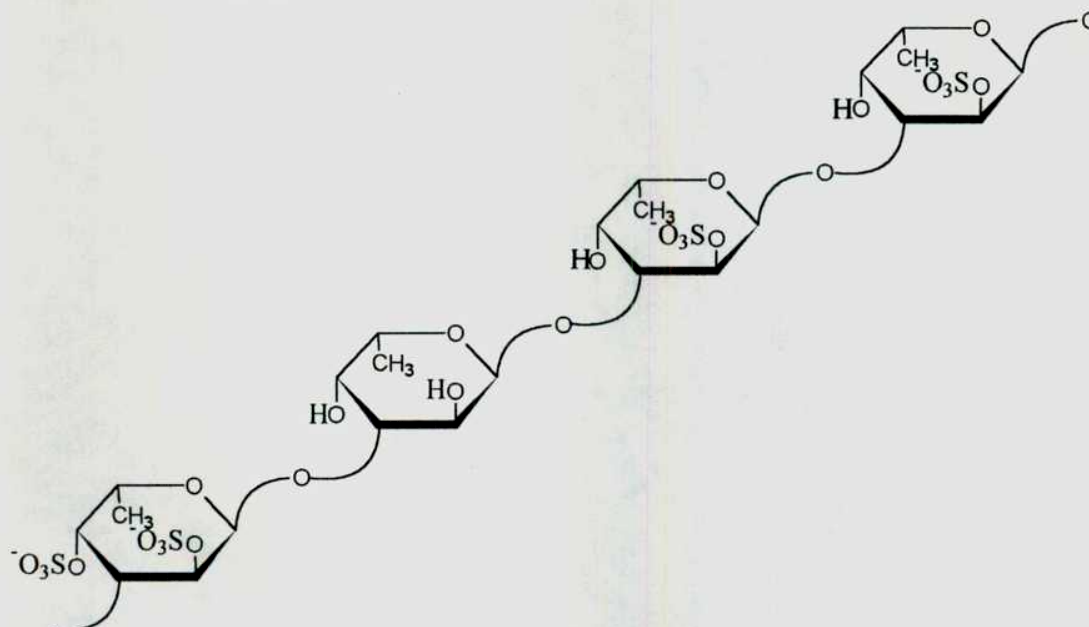


Fig. 6 - Fucano sulfatado de *Ludwigothurea grisea*

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Muchos metabolitos secundarios aislados de organismos marinos han mostrado ser estructuralmente novedosos y poseer un gran espectro de actividades biológicas. Los trabajos realizados hasta el presente en nuestro país se relacionan con el estudio de polisacáridos, carotenoides, esteroides libres y terpenos de algas²⁰, esteroides de moluscos marinos²¹ y recientemente trabajos con esponjas y ascidias del Mar Argentino.

Respecto del *phylum Echinodermata* es sabido que estos organismos poseen interesantes metabolitos secundarios polares. Cerca de 250 esteroides, incluyendo glicósidos esteroidales y esteroides polihidroxilados fueron aislados de 50 especies diferentes de estrellas, que pertenecen a tres órdenes principales de la clase Asteroidea: Paxillósida, Valvátida y Forcipulata. De todas ellas, sólo *Cosmasterias lurida* (orden Forcipulata) y *Luidia ludwigi* (orden Paxillósida) estudiadas en este trabajo pertenecen al Atlántico Sur.

Dado que no existían estudios previos a este trabajo de los componentes esteroidales polares de ningún equinodermo del Atlántico Sur, se decidió comenzar a trabajar en el aislamiento y la elucidación estructural de metabolitos secundarios de organismos pertenecientes a tres clases del *phylum Echinodermata*. En ese sentido se realizó el estudio químico de los asteroideos *Cosmasterias lurida* (Philippi, 1858) y *Luidia ludwigi scotti* Bell (1917), los ofiuros *Ophioplocus januarii* (Lütken, 1856), *Ophionotus victoriae* (Bell, 1902), *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875), y el equinoideo *Encope emarginata* (Leske, 1778).

Se estudió además el ofiuro tropical *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816).

1- PHYLUM ECHINODERMATA - CLASE ASTEROIDEA

a) glicósidos esteroidales

Las propiedades tóxicas de las estrellas de mar se conocen desde hace muchos años²². En 1960 Hashimoto y Yasumoto²³ demostraron que su toxicidad está asociada con compuestos similares a las saponinas de plantas. Extrajeron la estrella *Asterina pectinifera* por un método desarrollado para saponinas de plantas y el extracto, una mezcla de saponinas, resultó ser ictiotóxico y hemolítico. Hay informes de toxicidad contra anélidos, moluscos, artrópodos y vertebrados^{2,22,24,25}. Es probable que las saponinas actúen como agentes químicos de defensa repeliendo hongos, protistas, parásitos y predadores. La respuesta de "escape" de anémonas, erizos y especialmente de algunas especies de moluscos en presencia de estrellas es un fenómeno fascinante y conocido. Mackie y col.²⁶ probaron que la respuesta de escape observada en el molusco *Buccinum undatum* es producida por saponinas.

Una aproximación a la función de las saponinas en asteroideos podría lograrse examinando las concentraciones de asterosaponinas en distintos tejidos y las fluctuaciones de su concentración durante un ciclo metabólico anual.

Yasumoto *et al.*²⁷ informan que la concentración de saponinas en *Asterias amurensis* es baja en invierno pero se incrementa rápidamente en junio (verano) con un máximo en el mes de julio. El desove ocurre en esa especie en el período de menor concentración de saponinas. Sin embargo en *Asterias vulgaris*²⁸ el contenido de saponinas se incrementa durante el invierno y decrece en primavera por lo que las asterosaponinas parecen jugar distintas funciones en cada una de estas estrellas.

Ikegami *et al.*²⁹ identificaron como una saponina al compuesto inhibidor del desove en los ovarios de *Asterias amurensis*. Más recientemente Fujimoto *et al.*³⁰ identificaron a tres saponinas llamadas Co-Aris I, II y III aisladas de la gelatina de huevos de *Asterias amurensis* como cofactores de la reacción acrosomal. Extractos de estrellas que contienen mezclas de saponinas muestran variadas actividades farmacológicas: actividad hemolítica^{2,26}, citotoxicidad contra células tumorales *in vitro*^{31,32,33}, actividad antiviral³⁴, actividad antiinflamatoria, analgésica e hipotensiva³⁵.

Extractos de saponinas de estrellas inhiben el desarrollo de huevos de erizos³⁶, provocando una interrupción de la multiplicación celular, citolisis y animalización de la larva. Estos efectos son atribuidos a una perturbación en la biosíntesis de proteínas, ADN y ARN. Un trabajo reciente sobre el efecto de 16 saponinas de estrellas en la fertilización de huevos de erizos muestra que todos los compuestos inhiben los embriones en su desarrollo. Además las saponinas con cadena lateral tipo ergostano resultaron más activas que aquéllas sin grupo metilo en C-24, y los pentaglicósidos más activos que los hexaglicósidos³⁷. Otro trabajo sobre la actividad biológica de saponinas y esteroides polihidroxilados de estrellas confirma la evidencia de citotoxicidad e inhibición de bacterias Gram positivas aunque se informa sólo moderada actividad antiviral y ausencia de inhibición de bacterias Gram negativas³⁸. Dubois *et al.*³⁹ establecieron para las asterosaponinas denominadas Pectiniósidos A, C, y E actividad antitumoral frente a células L1210 y KB. (IC₅₀ 10,0, 11,0 y 8,8 µg/ml y 10,0, 10,8 y 11,5 µg/ml respectivamente).

De acuerdo con su estructura química los glicósidos esteroidales aislados de estrellas de mar se subdividen en cuatro grupos:

- 1- Asterosaponinas
- 2- glicósidos cíclicos
- 3- glicósidos de esteroides polihidroxilados
- 3- glicósidos de esteroides fosfatados.

1- Las Asterosaponinas representan el grupo más numeroso de glicósidos esteroidales aislados de estrellas. Todas las asterosaponinas aisladas hasta el momento presentan algunas características comunes. Esto es, una aglicona esteroideal $\Delta^{9(11)}$ dioxigenada ($3\beta,6\alpha$), a menudo una función oxigenada en la cadena lateral (C-23), un grupo sulfato en C-3 y una cadena de oligosacárido constituida por 3 a 6 azúcares unida a C-6 (fig. 7). Respecto de la porción glicosídica, los monosacáridos están en su forma piranósica con una configuración anomérica β (excepto arabinosa donde es α). Se repite además, una secuencia de uniones interglicosídicas: la ramificación está siempre localizada en el segundo monosacárido (xilosa o quinovosa) a partir de la aglicona y una quinovosa terminal está siempre unida al C-2 del azúcar ramificado. Los azúcares más comunes son: D-fucosa, D-quinovosa, D-xilosa, D-galactosa y D-glucosa. Otro azúcar menos común es la L-arabinosa. Esta fue encontrada en saponinas aisladas de *Linkia laevigata*⁴⁰ *Henricia laeviuscola*⁴¹, *Asterina pectinífera*⁴² y *Patiria miniata*⁴³.

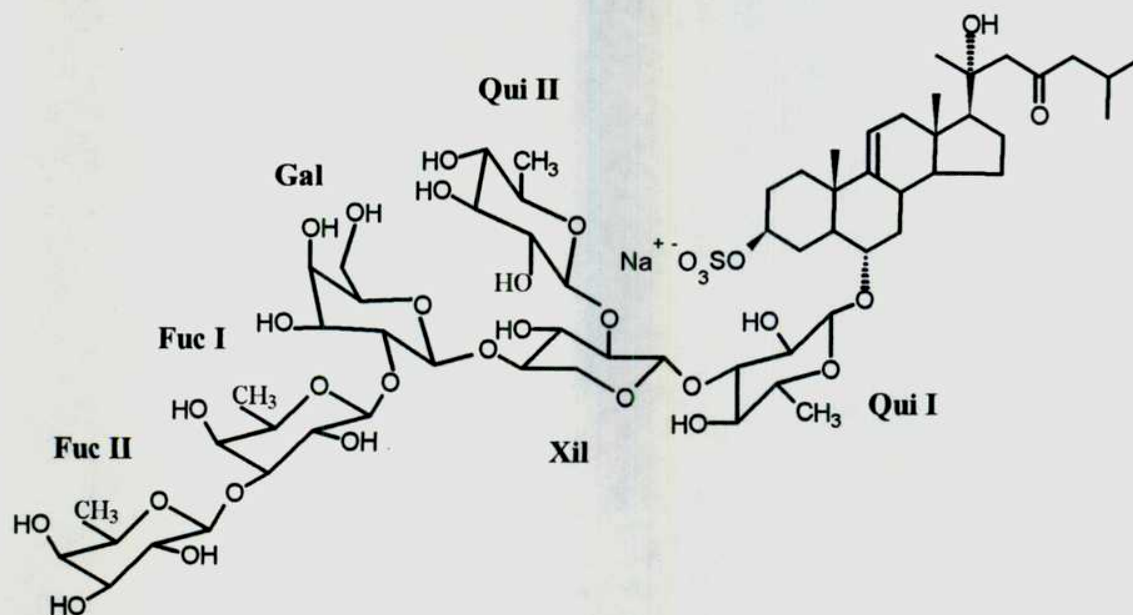


Fig. 7 - Marthasterósido A₁, asterosaponina aislada de *Marthasterias glacialis*¹⁶¹

Las asterosaponinas se encuentran usualmente como una mezcla muy compleja de moléculas semejantes, acompañadas de otros compuestos polares como esteroides polihidroxilados libres o glicosidados con una o dos unidades de hidrato de carbono. Un ejemplo de la complejidad de la mezcla de constituyentes polares lo proporciona la estrella *Coscinasterias tenuispina*⁴⁴, de la cual se aislaron 19 compuestos: 10 asterosaponinas, 6 glicósidos de esteroides polihidroxilados y 3 esteroides polihidroxilados; o la estrella *Culcita novaeguineae*⁴⁵ de la que se aislaron 11 glicósidos de esteroides polihidroxilados y 5 esteroides polihidroxilados libres. Es importante notar, sin embargo, que en este último caso se obtuvieron pequeñas cantidades de los compuestos puros, desde 2,0 a 9,2 mg a partir de 3,8 kg de estrellas. Dada la complejidad de las mezclas de compuestos polares de estrellas, el aislamiento de saponinas puras, así como de otros esteroides polares se logra mediante una combinación de técnicas cromatográficas.

Las asterosaponinas están presentes en la mayoría de las especies de asteroideos estudiadas. Las únicas excepciones son dos especies del género *Echinaster* que contienen glicósidos esteroidales cíclicos y la estrella *Euretaster insignis* en la que tampoco se han encontrado saponinas aunque sí un grupo de 3,21-dihidroxiesteroides disulfatados además de los más usuales 3 β -hidroxiesteroides sulfatados⁴⁶. En contraste con la preponderancia de esteroides Δ^7 en estrellas, en *Euretaster insignis* se encontró un muy bajo porcentaje de colest-7-en-3 β -ol (3% de la mezcla total de esteroides) y grandes cantidades de 5 α -esteroides, probablemente una consecuencia de la ausencia de asterosaponinas en esa especie. Dado que las saponinas son moléculas frágiles que aparecen como mezclas complejas, a menudo difíciles de separar en sus compuestos individuales, en los primeros trabajos se estudiaron las agliconas obtenidas por hidrólisis ácida (HCl 2N) de las mezclas crudas de saponinas. Esta metodología dio origen a algunos "artefactos". Así, asterona (3 β ,6 α -dihidroxi-5 α -pregn-9(11)-en-20-ona) (**fig. 8**)

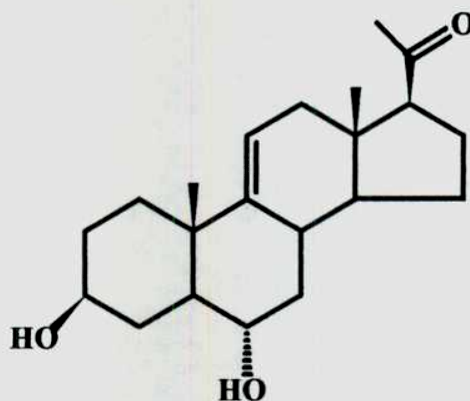


Fig. 8 - Asterona obtenida por hidrólisis ácida de asterosaponinas

un artefacto obtenido por reacción retro-aldólica a partir del Thornasterol A ($3\beta,6\alpha$ -dihidroxi- 5α -colest-9(11)-en-23-ona) es el esteroide más abundante aislado por hidrólisis ácida de asterosaponinas⁴⁷. También figuran en literatura^{48,49} $\Delta^{17(20)}$, $\Delta^{20(22)}$ y $\Delta^{13(14)}$ -17-metil-18-nor-esteroides, claros artefactos generados en la hidrólisis.

La primera estructura completa de una asterosaponina se informó en la literatura en 1978. Se trata del Thornasterósido A (**fig. 9**), la principal saponina de la estrella *Achantaster planci*⁵⁰. El Thornasterósido A fue luego encontrado en 15 especies de los 3 órdenes de Asteroideos. La segunda saponina fue el Glicósido B2, aislado por primera vez de *Asterias amurensis*. Este difiere del Thornasterósido A sólo en la fucosa terminal que es reemplazada por quinovosa⁵¹. Poco después un trabajo del grupo de Ikegami⁵² describe la estructura de la Ovarian Asterosaponin-1 (OA-1) también aislada de *Asterias amurensis*. Luego de la elucidación estructural del Thornasterósido A, el Glicósido B2 y la asterosaponina OA-1 aparecieron en literatura desde 1983 una serie de trabajos que describen las estructuras de unas 50 asterosaponinas.

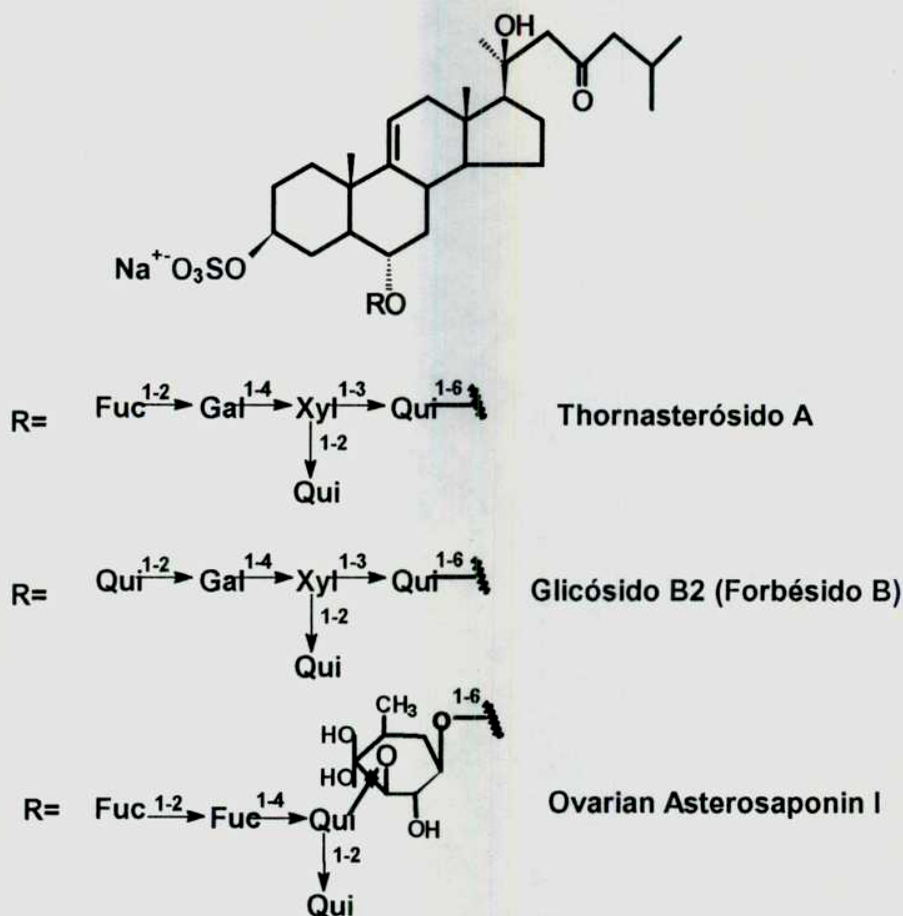


Fig. 9 - Primeras estructuras completas de asterosaponinas

2- Los glicósidos cíclicos sólo fueron aislados de dos especies del género *Echinaster* (**fig. 10**) (*Echinaster sepositus*^{53, 54} y *Echinaster luzonicus*⁵⁵). No contienen sulfato y la carga es provista por un grupo glucurónico en la cadena de azúcares. Tienen una aglicona Δ^7 -3 β ,6 β dioxigenada, y lo más remarcable es que el trisacárido está ciclado entre C-3 y C-6 de la aglicona esteroidal. El significado taxonómico de estos compuestos es cuestionado ya que en *Echinaster brasiliensis* colectada en la isla Gran Bahama (Mar Caribe), los esteroides cíclicos están ausentes y se aislaron en cambio asterosaponinas como el Marthasterósido A₁ (**fig. 7**).

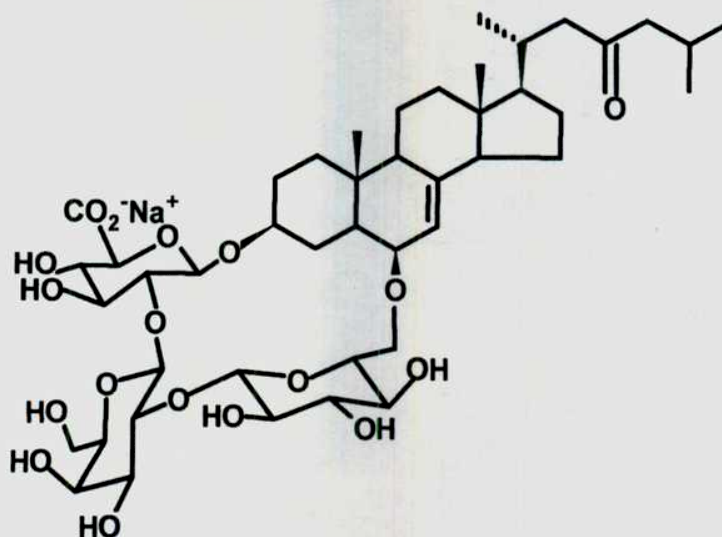
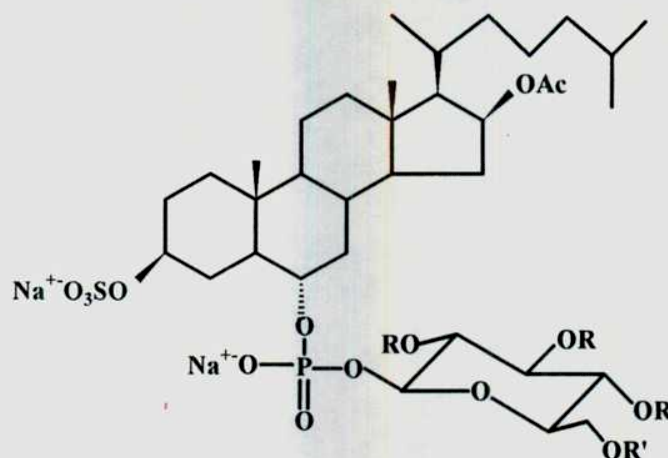


Fig. 10 - Sepsitosido A, glicósido cíclico aislado de *Echinaster sepositus*⁵³

3- Los glicósidos de esteroides polihidroxilados presentan amplias variaciones estructurales. Muchas veces se los encuentra sólo en pequeñas cantidades y como mezclas complejas. Están compuestos de una aglicona esteroidal polihidroxilada glicosidada en general con una o dos unidades de monosacárido unidos al C-3 ó al C-24 de la aglicona esteroidal. Existen ejemplos de triglicósidos aislados de la estrella *Fromia monilis*.^{56,57} Los monosacáridos más encontrados son D-xilopiranososa, a veces metilada en posición 2, 4 ó ambas y L-arabinosa en su forma furanósica. Existen ejemplos de galactofuranósidos,^{58,59,60} xilofuranósidos^{61,62,63} y fucofuranósidos⁵⁵. Muchas veces contienen un grupo sulfato en posición 3 β , 6 α , 15 α , o en el azúcar.

4- Los glicósidos esteroidales fosfatados fueron recientemente aislados de la estrella *Tremaster novaecaledoniae*⁶⁴ colectada a 530 m de profundidad cerca de Nueva Caledonia. Estos tres esteroides polihidroxilados presentan un grupo fosfato al cual se une el azúcar y constituyen el primer informe de esteroides fosfatados. (**fig. 11**)



Tremasterol A	$\text{R} = \text{R}' = \text{H}$
B	$\text{R} = \text{R}' = \text{Ac.}$
C	$\text{R} = \text{H}, \text{R}' = \text{Ac.}$

Fig. 11 -Tremasterol A-C. Únicos ejemplos de esteroides fostatados, aislados de la estrella *Tremaster novaecaledoniae*.

b) esteroides polihidroxilados

Además de glicósidos esteroidales, se han aislado de estrellas esteroides polihidroxilados no glicosidados, en algunos casos sulfatados, los cuales pueden contener hasta 9 grupos hidroxilo en sus moléculas. De todos los compuestos naturales conocidos solamente algunas ecdisonas⁶⁵ (hormonas que provocan la muda en insectos) pueden compararse con los esteroides polihidroxilados de estrellas respecto al número de grupos hidroxilo. Estos compuestos están presentes en asteroideos en bajas concentraciones del orden de 0,001 a 0,0001% del peso húmedo del organismo.

En los esteroides polihidroxiados de estrellas es común encontrar la estructura colest-3 β ,6 α (ó β),8,15 α (ó β),16 β -pentol. Un primer subgrupo posee un hidroxilo en C-26 usualmente con configuración 25S. En otro subgrupo la cadena lateral se encuentra hidroxiada en C-24 con configuración 24S. Es posible encontrar hidroxilos adicionales en las posiciones 4 β ,5 α ,7 α (ó β) y 14 α , en general dispuestos hacia un lado del núcleo esteroide. Esto otorga a las moléculas un carácter anfifílico, con una región hidrofílica y otra hidrofóbica. Pueden encontrarse en la forma sulfatada y en ese caso el grupo sulfato se localiza en las posiciones 3 β ,6 α ,15 α ó 24.

c) cerebrósidos y lactósidos

Todos los esfingolípidos contienen 3 componentes básicos: una molécula de ácido graso, una molécula de esfingosina o uno de sus derivados y una cabeza polar. La base esfingosina se encuentra conectada por su grupo amino mediante un enlace amida a un ácido graso saturado de cadena larga o a uno monoinsaturado de 18 a 26 átomos de carbono. El compuesto resultante con dos colas no polares (ceramida) es la estructura básica de todos los esfingolípidos.

Se han aislado de asteroideos glicoesfingolípidos^{66,67} compuestos (**fig. 12**) por una cadena de ácido graso y una o dos unidades de hexosa como grupos polares, unidas mediante un enlace β -glicosídico al carbono 1 de la base según se trate de cerebrósidos o lactósidos, respectivamente. Los más comunes incluyen como base una unidad de esfingosina, 4,8-esfingodieno ó 4-hidroxiesfingosina.

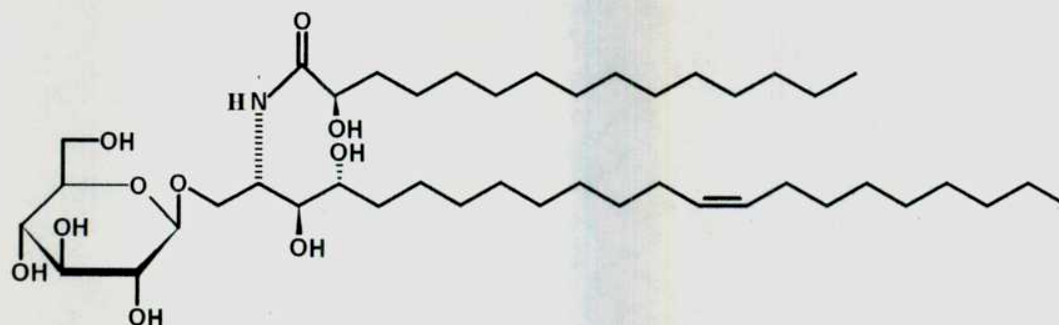


Fig. 12 - Asteriacerebrosido D, aislado de *Asterias amurensis*⁶⁶

d) Glucoesfingolípidos ácidos o gangliósidos

Contienen como grupos de cabeza polar polisacáridos que incluyen una o más unidades de N-acil derivados del ácido N-acetil neuramínico (NANA) que reciben el nombre genérico de ácidos siálicos (**fig. 13**). Casi todos los gangliósidos conocidos poseen un resto de glucosa unido a una ceramida mediante enlace glucosídico, se encuentran también restos de D-galactosa y de N-acetil-D-galactosamina.

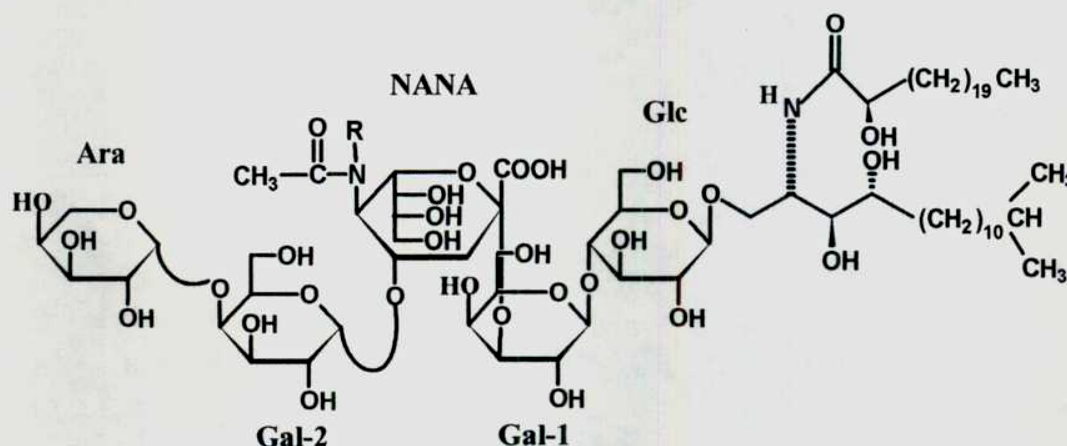


Fig. 13 - Gangliósido LG-1 aislado de *Astropecten latespinosus*⁶⁸

e) alcaloides guanidínicos

En un trabajo muy reciente Palagiano y col.⁶⁹ informan el aislamiento de 4 alcaloides guanidínicos, dos de ellos novedosos (Fromiamycalina y Celeromycalina) (fig. 14) de las estrellas *Fromia monilis* y *Celerina heffernani*. Los dos primeros fueron aislados previamente de las esponjas *Ptilocaulis spiculifer* y *Crambe crambe* respectivamente. Estos compuestos con potente actividad antiviral, citotóxicos y antifúngicos constituyen una nueva familia de guanidinas pentacíclicas sustituidas por un ω -hidroxiácido unido a una unidad de hidroxiespermidina.

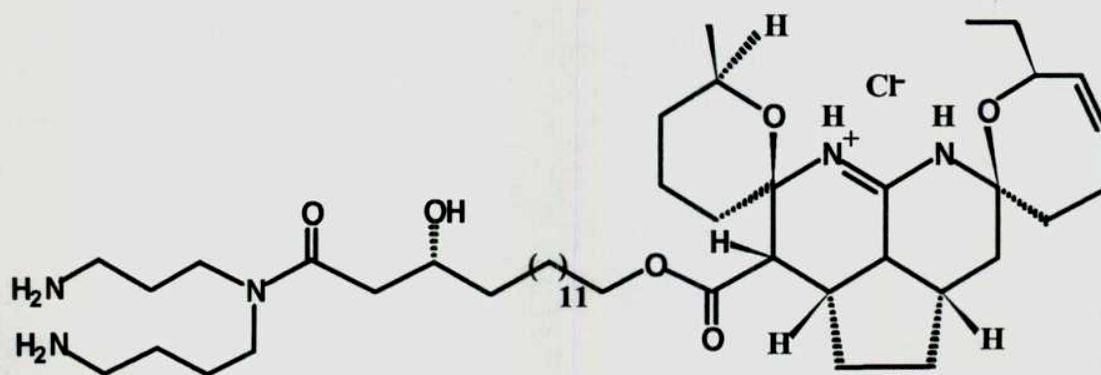


Fig.14 - Fromiamycalina - Alcaloide guanidínico aislado de los asteroideos *Fromia monilis* y *Celerina heffernani*

f) carotenoproteínas

La coloración de las estrellas es debida a la presencia de carotenoproteínas. Se han aislado carotenoproteínas azules, púrpuras y naranjas de *Asterias rubens*^{70, 71}, *Echinaster sepositus*⁷² y *Linckia Laevigata*⁷³ (fig. 15). En asteroideos es común

encontrar distintos carotenoides unidos a las proteínas. Así la carotenoproteína púrpura asteriarubina de *Asterias rubens* contiene 7,8,7',8'-tetradehidroastaxantina (43%), 7,8-didehidroastaxantina (24%), astaxantina (14%), 4-oxo-mytiloxantina (10%) y canthaxantina (3%). En este sentido las carotenoproteínas aisladas de equinodermos difieren de las carotenoproteínas de crustáceos compuestas de un sólo carotenoide: astaxantina. Estos complejos caroteno-proteínas podrían servir o bien de alarma y desaliento a posibles predadores o bien de mimetismo con el medio.

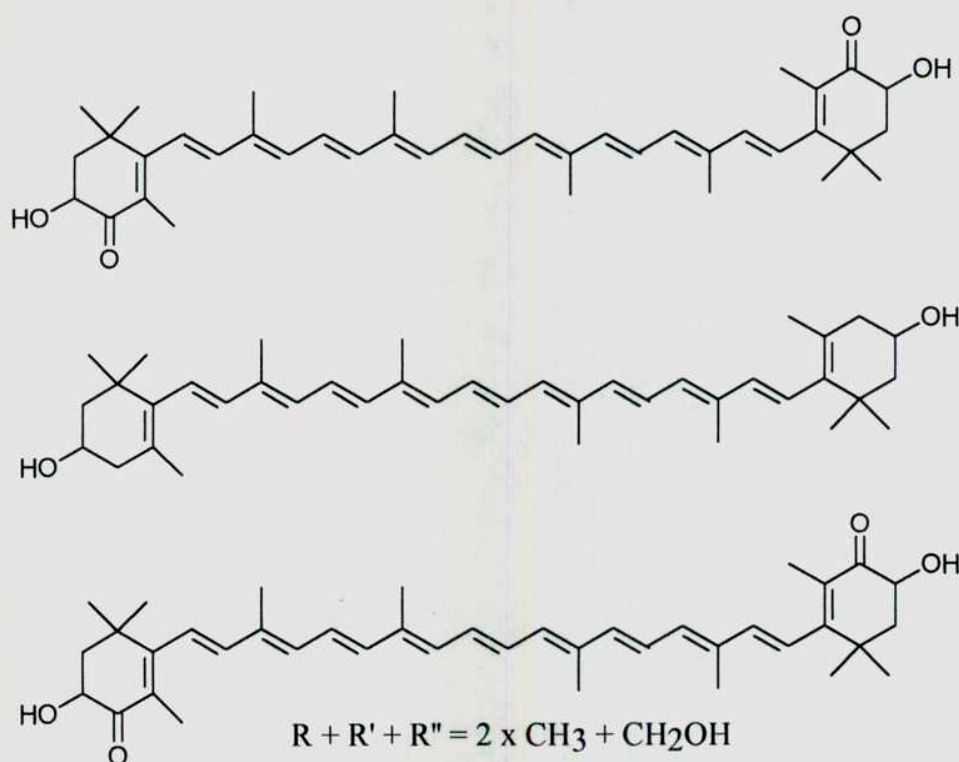


Fig. 15 - Carotenoides presentes en *Linckia laevigata*: Astaxantina, Zeaxantina y Hidroxiclatriaxantina.

h) esteroides

El progreso en el área de los esteroides marinos fue muy importante en los últimos años. Cerca de 200 esteroides monohidroxilados fueron aislados de organismos marinos, muchos de ellos sin contraparte en el ámbito terrestre. Los esteroides son compuestos presentes en todos los eucariotes, pero la naturaleza de los esteroides de un organismo en particular presenta variaciones considerables. Las mezclas de esteroides son a menudo complejas y contienen estructuras no convencionales en los eucariotes menos avanzados. Los organismos procariontes carecen en general de esteroides pero contienen a menudo alcoholes politerpénicos que podrían cumplir funciones metabólicas equivalentes. La evolución de los esteroides está relacionada con el progreso de las formas procarióticas hacia las eucarióticas. El rol básico de los esteroides es el mantenimiento de la fluidez de la membrana plasmática, si bien también estos compuestos son los precursores de diversas clases de compuestos biológicamente activos como por ejemplo los esteroides polihidroxilados de estrellas.

Goad y col.⁷⁴ sugirieron que existen 4 posibles fuentes de esteroides en invertebrados marinos: **a-** biosíntesis *de novo*; **b-** asimilación por el huésped de los esteroides producidos por un alga, una bacteria u hongo simbiótico; **c-** asimilación de esteroides dietarios y **d-** modificación de esteroides dietarios. Cada organismo establece el balance entre las distintas fuentes.

El extraordinario número de esteroides que poseen diferentes funciones biológicas derivados de estos precursores comunes indica que los esteroides son excelentes materiales de partida para la biosíntesis de compuestos biológicamente activos.

La diversidad estructural de esteroides marinos, muy superior a la encontrada en el ámbito terrestre sugiere la pregunta. ¿cuál es el significado de estas estructuras

inusuales? y ¿por qué los organismos marinos constituyen una fuente tan importante de esteroides poco comunes comparada con los terrestres?. Es posible que la diversidad de una familia de metabolitos secundarios no sea el reflejo de diferentes requerimientos fisiológicos sino de distintos caminos biosintéticos relacionados con la adaptación a las cambiantes condiciones existentes en los océanos.

Durante muchos años el esqueleto de 27 a 29 carbonos fue una constante y las variaciones ocurrieron sólo en el C-24 de la cadena lateral. Luego de la caracterización del primer esteroide de 26 carbonos aislado por primera vez del molusco *Placopecten magallanicus*⁷⁵ y luego de muchos invertebrados marinos y del fitoplancton, comienzan a aparecer en literatura muchos esteroides "no convencionales", con cadenas laterales modificadas por pérdida o adición aparente de algunos átomos de carbono en posiciones biogénicamente sin precedentes, así como esteroides con anillos inusuales.

En el *phylum Echinodermata* las mezclas de esteroides son de complejidad comparable con otros *phylum* de invertebrados. En general colesterol es el esteroide más abundante en crinoideos, ofiuros y equinoideos y colest-7-en-3 β -ol en holoturias y asteroideos. Algunos esteroides novedosos han sido aislados de equinodermos, entre ellos, asterosterol⁷⁶ (24-norcolesta-7,22-dien-3 β -ol), 24-norcolest-5-en-3 β -ol⁷⁷, amurasterol⁷⁸ ((22E)-27-nor-(24S)-24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol) y acanthasterol⁷⁹ ((22R,23R,24R)-22,23-metilen-23,24-dimetil-5 α -colestan-7-en-3 β -ol).

BIOSÍNTESIS

Existen en literatura especulaciones acerca del origen y modo de formación de metabolitos marinos. Los estudios biosintéticos se han realizado fundamentalmente con algas y microorganismos como consecuencia de la dificultad de cultivo en los otros

phylum. En muchos casos, se presume que ciertos caminos biosintéticos no difieren de los conocidos en plantas y organismos terrestres. Sin embargo, existen algunas diferencias entre organismos terrestres y marinos. Por ejemplo, los grupos halógeno e isocianato son sustituyentes comunes en metabolitos de algas y esponjas aunque rara vez se observan en metabolitos terrestres. Los metabolitos marinos difieren a menudo de los terrestres en la estereoquímica absoluta. Es importante notar que el medio marino provee condiciones biosintéticas diferentes a las terrestres. El pH del mar tiene valores de 8,2 a 8,5 por efecto del buffer carbonato/bicarbonato. El agua de mar contiene más de un 4 % de sales y por tanto una presión osmótica de 15-25 atmósferas.

Respecto a la biosíntesis en asteroideos, la introducción de [4- ^{14}C] colesterol en *Asterias vulgaris* y *Asterias amurensis*⁸⁰ produjo luego de la hidrólisis, asterona marcada en ambos casos (fig. 16).

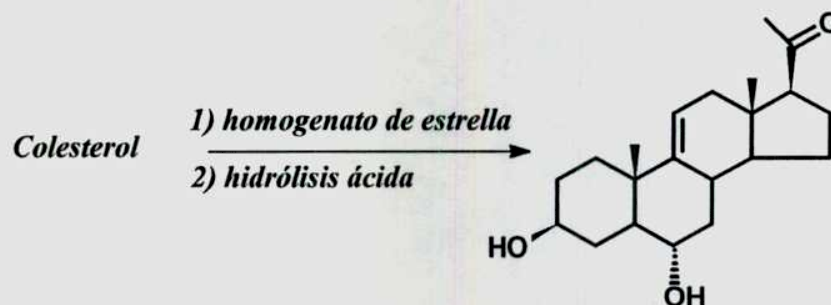


Fig. 16 - 4- ^{14}C -asterona en *Asterias vulgaris* y *Asterias amurensis*.

Schoenmakers⁸¹ aisló progesterona y pregnenolona marcadas por tratamiento de *Asterias rubens* con [4- ^{14}C -colesterol], lo cual prueba la existencia de un sistema enzimático capaz de cortar la cadena lateral de colesterol.

En un trabajo de Goad y col.⁸² se sugiere que el dieno colest-7,9(11)-dien-3 β -ol es producido a partir de colest-5,7-dien-3 β -ol en *Asterias rubens*.

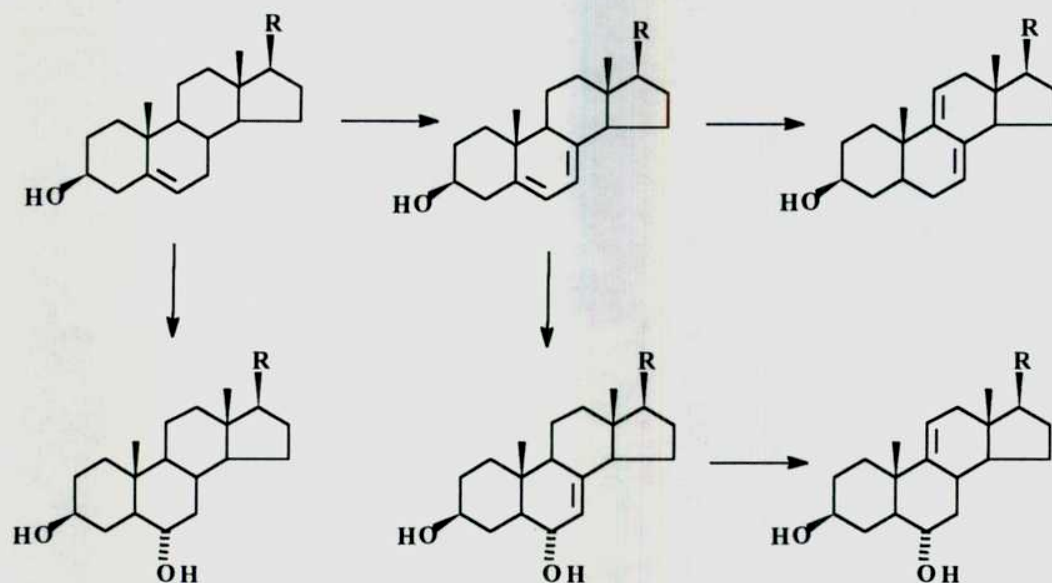


Fig. 17 - Precursores biosintéticos de asterosaponinas

La figura 17 muestra una secuencia razonable para la funcionalización del núcleo esteroidal. Esteroides 6 α -hidroxi- Δ^7 son precursores inmediatos de asterosaponinas.

Sheikh et al.⁸³ sugieren que la función 23-oxo de muchas agliconas de asterosaponinas podría provenir a través de un epóxido C22(23) formado en el doble enlace C-22. La insaturación en esa posición es común en esteroides marinos y existen evidencias que las estrellas pueden introducir ese doble enlace en una cadena saturada⁸⁴. Minale et al.⁶³ aislaron epóxidos de este tipo de la estrella de mar *Echinaster sepositus*, una especie cuya aglicona mayoritaria posee una función 23-oxo.

Considerando todos los metabolitos esteroidales aislados de asteroideos, Elyakov et al.⁸⁵ concluyen que existe en estrellas un conjunto de enzimas capaces de

oxidar colesterol, ergosterol y estigmasterol. Las posiciones de dichas oxidaciones serían las indicadas con flechas (**fig. 18**).

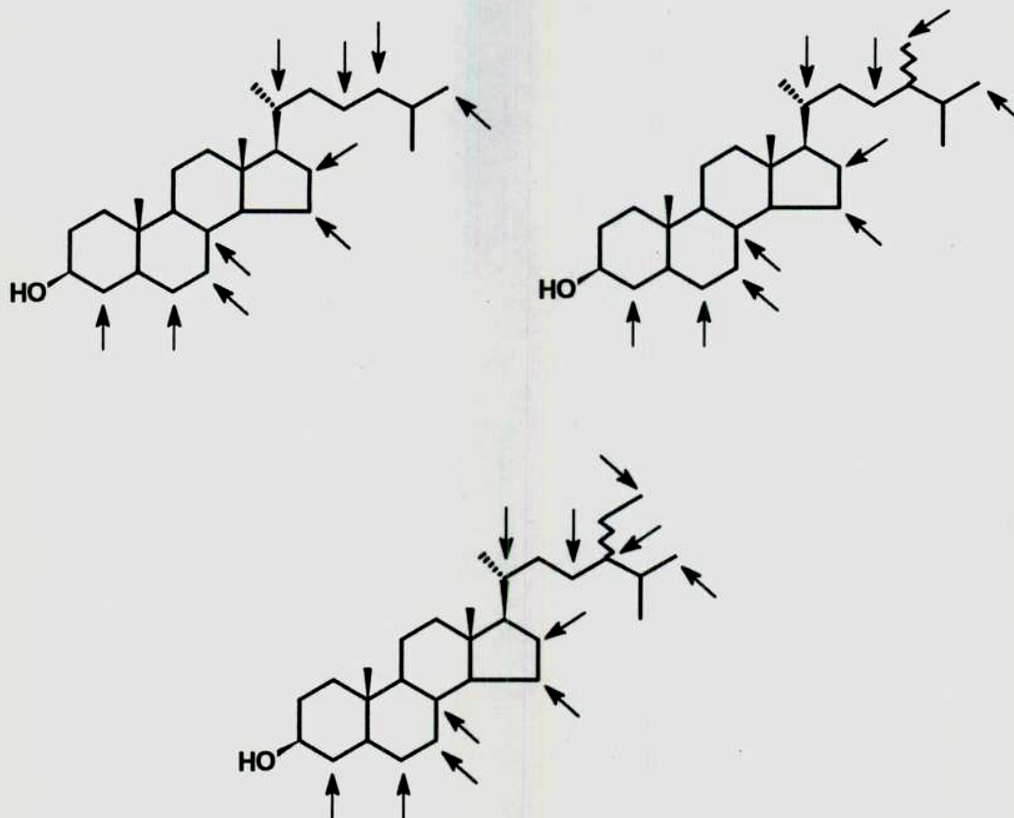


Fig. 18 - Posiciones biosintéticamente oxidables en asteroideos.

Algunos equinodermos contienen bacterias simbiotes en su sistema digestivo que pueden proveer nutrientes como ácidos grasos al huésped⁸⁶.

El camino biosintético de la cadena de carbohidratos de asterosaponinas no se conoce.

*Descripción
del trabajo realizado*



Cosmasterias lurida (Philippi, 1858)
(1:1)

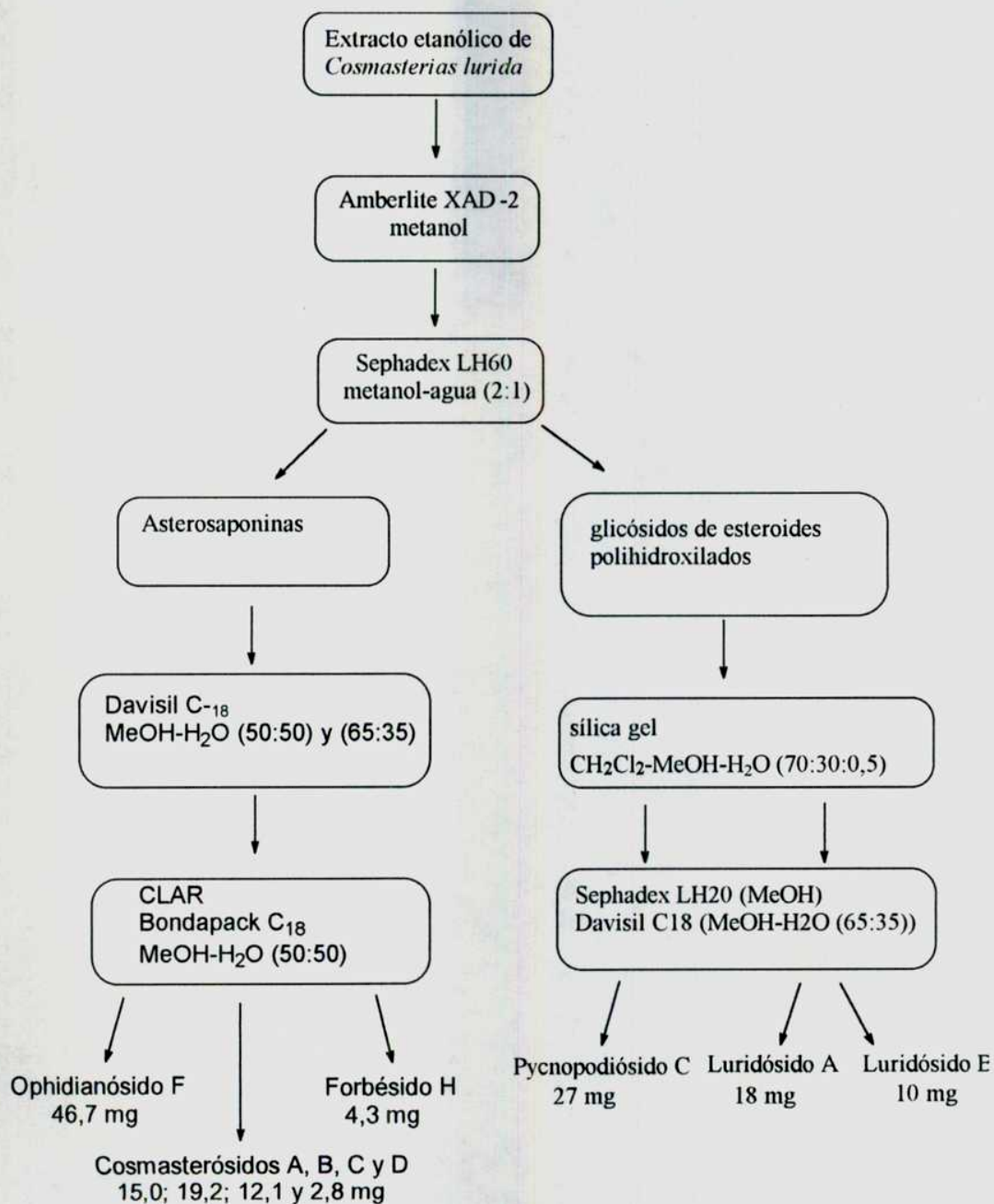
1-1 ASTEROSAPONINAS DE *Cosmasterias lurida*

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

La estrella *Cosmasterias lurida* (Philippi, 1858) fue recolectada en 1989 en el Golfo Nuevo, en las cercanías de la ciudad de Puerto Madryn, provincia de Chubut, e identificada por el Dr. Alejandro Tablado del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" donde se conserva una muestra "voucher" (MACN N° 31.231).

La estrella *Cosmasterias lurida* está distribuida en el extremo austral de América del Sur, desde los 35° S en el océano Atlántico hasta Tierra del Fuego, y en el océano Pacífico hasta el centro de Chile (30 °S). Es posible encontrarla hasta a 636 m de profundidad. Existe un estudio previo de los esteroides aislados de *Cosmasterias lurida*⁸⁷. En el presente trabajo se estudiaron los esteroides polares (asterosaponinas y esteroides polihidroxilados glicosidados). Tras la recolección (6 kg) los organismos fueron conservados a -20°C. Este material fue homogeneizado en EtOH (6 litros) y centrifugado. Luego de la evaporación del EtOH en evaporador rotatorio a presión reducida, el extracto acuoso así obtenido fue percolado a través de una columna de Amberlite XAD-2 (1 kg) la cual fue lavada con agua destilada hasta reacción negativa de cloruros con una solución de nitrato de plata 0,1 N. Este método permitió eliminar las sales del extracto para luego eluir con MeOH las saponinas y otros esteroides polares absorbidos en el Amberlite. El eluido metanólico se evaporó hasta obtener un material aceitoso (8,1 g), que fue purificado a través de una columna de filtración por gel (Sephadex LH60, 80 cm x 4 cm d. i. ; 100g) con MeOH - H₂O (2:1) como eluyente. Se recogieron fracciones de 10 ml y se analizaron por ccd de sílica gel con n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5) (fase superior) revelando por pulverización con H₂SO₄-H₂O (1:1) y posterior calentamiento en estufa a 110° C. Este paso permitió una buena

separación de la mezcla de asterosaponinas de los glicósidos de menor peso molecular (**esquema 1**).



Esquema 1

Las fracciones correspondientes a los tubos 25-45 y 46-65 contenían mezclas crudas de asterosaponinas. Cada fracción fue purificada por

cromatografía flash en columna seca de Davisil C₁₈ (35-75 μ) usando H₂O, un gradiente de mezclas MeOH-H₂O y finalmente MeOH como eluyente. Se recogieron fracciones de 50 ml que se analizaron por ccd de fase reversa (MeOH:H₂O (65:35)). La purificación final se realizó por CLAR con una columna μ -Bondapak C₁₈ (30 cm x 7,8 mm de d. i.) y MeOH:H₂O (50:50) como solvente.

De esta manera, se aislaron 4 asterosaponinas novedosas, dos pentaglicósidos, los **Cosmasterósidos A {1}** y **B {2}**, dos tetraglicósidos, los **Cosmasterósidos C {4}** y **D {5}**, y dos saponinas conocidas, el Ophidianósido **F {3}** aislado previamente de *Ophidiaster ophidianus*⁸⁸, *Linckia laevigata*⁴⁰ y *Thromidia catalai*⁸⁹ y el Forbésido **H {6}**, un triglicósido aislado de *Asterias forbesi*⁸⁰.

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ASTEROSAPONINAS

ESPECTROMETRÍA DE MASA

Las crecientes posibilidades de la espectroscopía de RMN ¹H y de ¹³C, el desarrollo de secuencias bidimensionales y los métodos de ionización suave (FAB) en espectrometría de masa permiten el estudio de asterosaponinas sin necesidad de degradar la molécula. A partir de los espectros FAB se obtiene no sólo el peso molecular de la saponina sin derivatizar sino además valiosa información acerca de la secuencia de azúcares. Los espectros FAB en modo positivo proporcionan el ión molecular en su forma protonada o cationizada [M + H]⁺ ó [M + C]⁺ donde M corresponde al peso molecular relativo de la sal de sodio o potasio de la saponina y C es la masa del catión utilizado en la matriz (Na ó K). Sin embargo la intensidad relativa de estos picos es variable siendo los más usuales [MSO₃Na + Na]⁺, [MSO₃K + K]⁺, [MSO₃Na + K]⁺, [MSO₃Na + H]⁺. El espectro

contiene además iones provenientes de fragmentaciones. Las más importantes corresponden a rupturas interglicosídicas. Se observan dos caminos de fragmentación. Uno en el que la carga positiva se localiza en los iones de la aglicona y otro con la carga positiva en los fragmentos de la cadena de azúcares. En los espectros de los Marthasterósidos B y C⁹¹, que sólo se diferencian en el doble enlace (Δ^{24}) de la cadena lateral de la aglicona (**fig. 19**) se observa que los fragmentos de la aglicona se desplazan dos unidades de masa al pasar del Marthasterósido B al C mientras que los fragmentos de los azúcares tienen masas idénticas.

Las rupturas pueden ocurrir a ambos lados de la unión interglicosídica con transferencia de protón. Komori *et al.*¹²² sostienen que la ruptura ocurre sólo en uno de los lados y asignan la diferencia de 16 unidades de masa a la coexistencia de iones cationizados con Na y K.

En los espectros FAB en modo negativo (FAB)⁻ se observa un intenso ión molecular negativo $[M_{so_3}]^-$ e iones correspondientes a fragmentaciones de las uniones interglicosídicas a partir del azúcar terminal, quedando ahora la carga localizada en el fragmento que contiene la aglicona. En los espectros de saponinas que contienen una cadena lateral de tipo 20-hidroxi-23-oxo, el fragmento principal es el que corresponde a la pérdida de la cadena lateral por ruptura de la unión C20-C22 con transferencia de protón (retroaldólica) para dar el ión de m/z $[M_{so_3} - 100]^-$.

Las técnicas de ionización suaves combinadas con las rutinas de espectrometría de masa - espectrometría de masa han resultado ser un método poderoso para la elucidación estructural de productos naturales. Se utilizaron técnicas de ionización por átomos rápidos (FAB) y técnicas de ionización a presión atmosférica, tal como electrospray (ESP). Esta última introdujo una revolución en las técnicas de ionización en fase líquida debido a que al realizarse

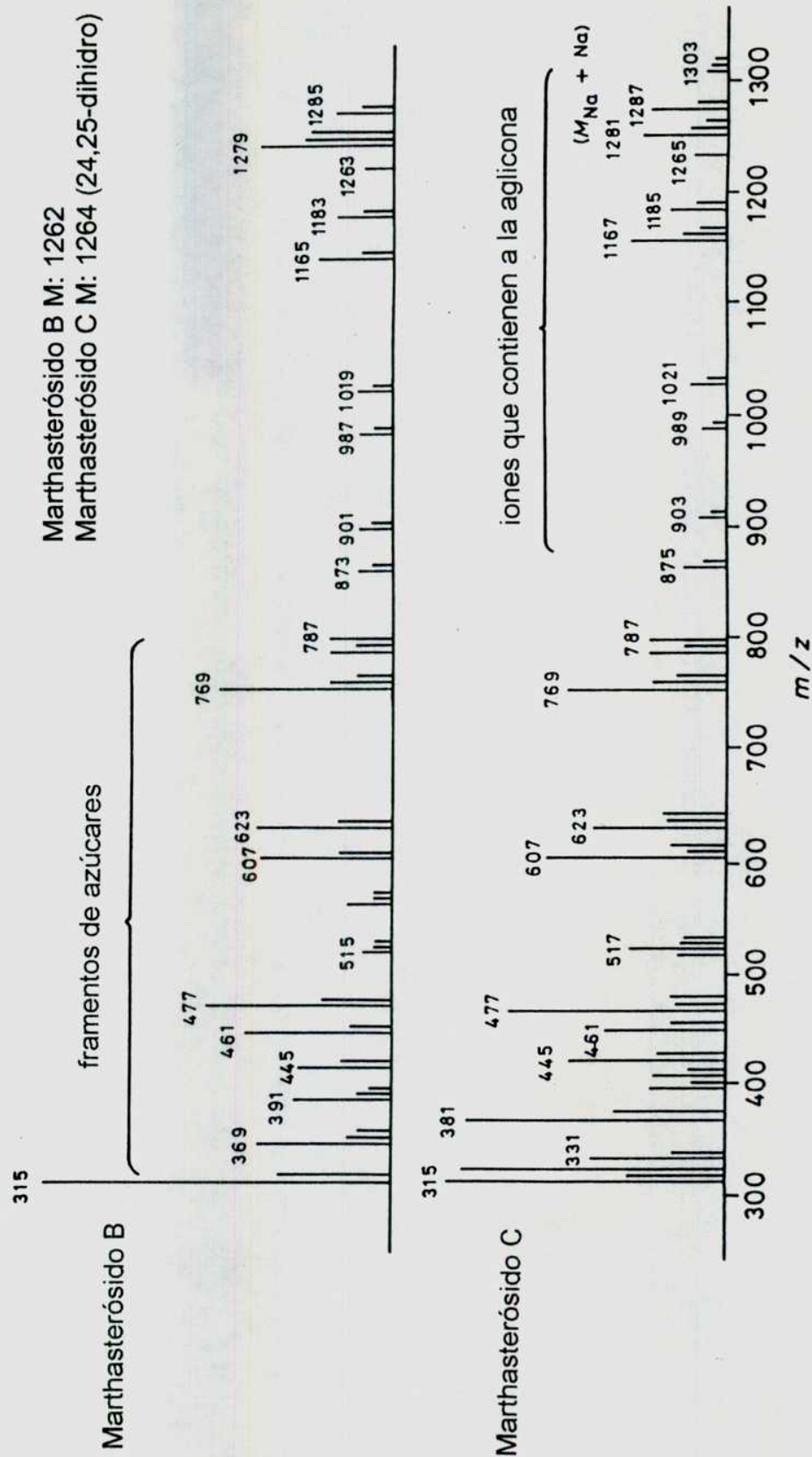


Fig. 19 - Espectros (FAB⁺) de los Marthasterósidos B y C

a presión y temperatura prácticamente ambiente es extremadamente suave, en comparación a sus antecesoras termospray y plasmaspray. Se obtienen iones cuasimoleculares intactos, evitando las rupturas de enlaces covalentes y favoreciendo las de asociaciones no covalentes. Ello posibilita la secuenciación rápida de estructuras de oligosacáridos y proteínas sin necesidad sistemática de técnicas de espectrometría de masa - espectrometría de masa. La técnica de FAB, proceso comparativamente de mayor energía, produce ruptura aunque controlada y en algunos casos, de uniones carbono - carbono, hecho que en determinadas circunstancias dificulta la interpretación directa del espectro. Uno de los factores que indirectamente afecta la sensibilidad del FAB frente al ESP, es el hecho de que en FAB y tal como se ve en los espectros que se presentan (**fig. 26 y 27**), la matriz provee una señal de base muy importante, que sólo puede evitarse en el caso de utilizar técnicas de espectrometría de masa - espectrometría de masa, filtrando el ion padre molecular y obteniendo el espectro de hijos. En el caso de ESP (**fig. 28**), señales de muy baja intensidad son significativas, debido a que la ausencia de matriz genera fondo limpio. Por otra parte, el ESP abarca rangos de masa entre dos y tres órdenes de magnitud mayores que FAB.

ESPECTROSCOPIA DE RMN ^1H

Los espectros de RMN ^1H de asterosaponinas se caracterizan por presentar una señal a δ 4,22 ppm ($W_{1/2} = 22$ Hz) y otra a δ 5,37 ppm (d. a., $J = 5,5$ Hz) correspondientes al hidrógeno en posición 3α y al H-11 de la aglicona esteroideal, respectivamente (**fig. 20 y 21**). El desplazamiento a δ 4,22 ppm de la señal de H- 3α establece también la ubicación de un grupo sulfato en C-3. La

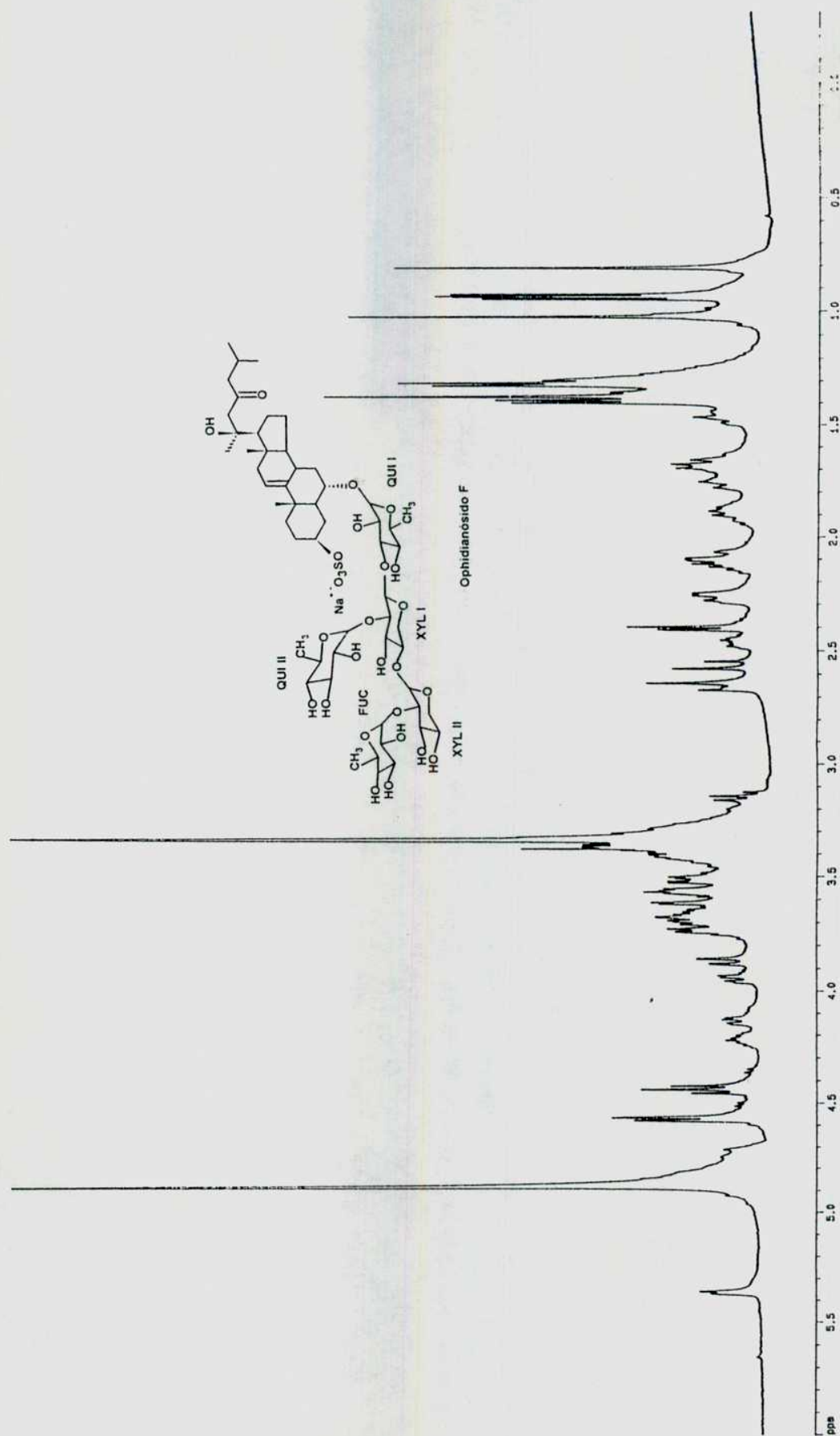


Fig. 20 - RMN ^1H (500 MHz) del Ophidianósido F {3}

señal del H-3 en el Marthasterósido B se observa a δ 4,20 ppm mientras que en el producto de su desulfatación se desplaza a δ 3,5-3,8 ppm⁹¹.

La señal del hidrógeno 6 β se superpone con las señales de los azúcares y su valor de desplazamiento químico no pudo ser determinado, aún a 500 MHz.

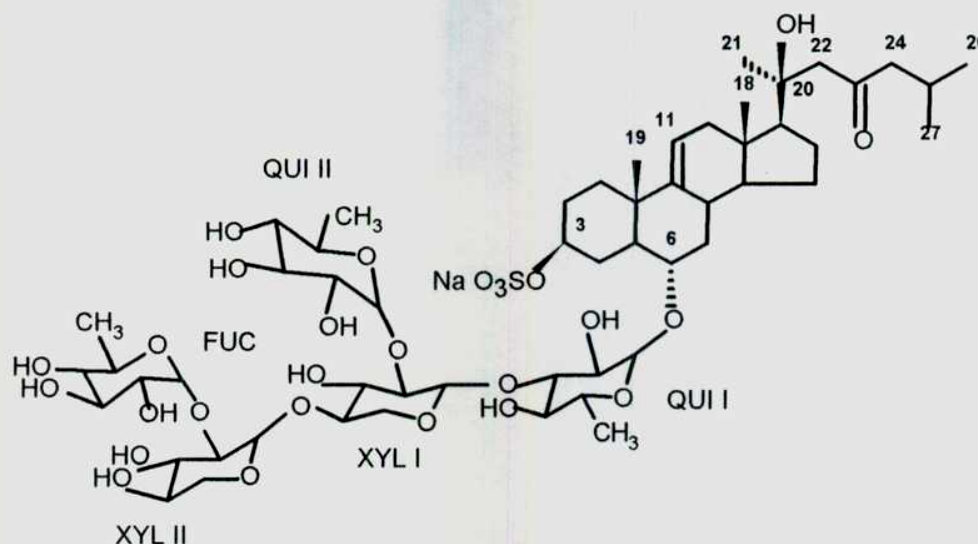


Fig. 21 - Ophidianósido F {3}

Hacia campos altos, donde predominan las señales de los metilenos de la aglicona, las señales de los metilos (C-18, C-19, C-21 y C-26/27) resultan muy útiles para la asignación estructural. También en esta región aparecen dobletes correspondientes a los metilos de los 6-desoxiazúcares (δ 1,25 a 1,48 ppm).

La presencia de una función hidroxilo en C-20 se reconoce fácilmente por el desplazamiento químico del metilo C-21 en el rango de δ 1,37 a 1,25. Estos valores son también indicativos de la configuración 20S dado que en (20S)- y (20R)-20-hidroxicolesterol aparece a δ 1,28 y 1,13 respectivamente. Además el valor del singulete del metilo C-18 aparece desplazado a δ 0,82 ppm frente al valor de δ 0,70 en agliconas sin hidroxilo en C-20 como el Marthasterósido B⁹¹.

En las saponinas cuyas agliconas poseen una cadena lateral de tipo 20S-hidroxi-23-oxoesteroide el metilo C-21 aparece a δ 1,37. En todas las saponinas

que contienen Thornasterol A, como el Ophidianósido F (**fig. 21**), se observan señales características a δ 2,60 (cuarteto AB, $J = 15$ Hz) y a δ 2,40 (d, $J = 6,5$ Hz) correspondientes a los metilenos de C-22 y C-24.

Respecto de la porción glicosídica, en el espectro RMN ^1H se observa un conjunto de señales muy superpuestas en el rango de δ 3,0 a 4,0 ppm. Las señales de los hidrógenos anoméricos aparecen en general como dobletes separados con constantes de acoplamiento (J) del orden de los 7,5 Hz (indicativo de unión β , α para arabinosa) en un rango de δ de 4,3 a 4,7 ppm. Las señales de los metilos de las 6-desoxi-hexosas (quinovosa y fucosa) aparecen en el rango de δ 1,25 a 1,48 ppm.

Las asterosaponinas que contienen la estructura β -D-quinovosa-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilosa-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovosa, estando esta última unida a C-6 del esteroide y el resto de la porción glicosídica unida a C-4' de la xilosa, muestran en su espectro RMN ^1H un doble doblete ($J = 12$ y 4 Hz) a δ 4,14 ppm correspondiente al H-5ec. de la xilosa. Esta señal aparece sola en el espectro y permite detectar xilosa 4-O sustituida. Si la xilosa no está sustituida en C-4, la señal de H-5ec aparece a δ 3,92 ppm. En el espectro de triglicósidos como el Forbésido H o los obtenidos por hidrólisis parcial con *Charonia lampas*, se observa el H-5ec a δ 3,91 ppm (dd, $J = 11,1$ y 4,5 Hz). En el espectro del Ophidianósido F aparecen dos dobles dobletes a δ 4,13 ($J = 11,5$ y 4,6 Hz) y a δ 3,95 ($J = 11,1$ y 4,6 Hz), este último como indicación de una segunda xilosa no substituida en C-4

ESPECTROSCOPIA DE RMN ^{13}C

La espectroscopía de RMN ^{13}C provee información muy importante respecto de la aglicona esteroideal de asterosaponinas. Las asignaciones se realizaron por secuencias DEPT y comparación de los espectros con esteroides

de referencia teniendo en cuenta los desplazamientos químicos provocados por distintas variaciones estructurales.

La comparación de los espectros de RMN ^{13}C de la saponina intacta respecto del producto desulfatado confirma la ubicación del sulfato en C-3. En el espectro del Marthasterósido B⁹¹, el C-3 se desplaza 7,4 ppm a campos altos y los C-2 y C-4 2,7 y 3,0 ppm a campos bajos, respectivamente, respecto al compuesto desulfatado.

Recientemente Findlay *et al*¹⁶¹ establecieron mediante técnicas RMN 2D todas las conectividades para los protones de tres saponinas conteniendo todas ellas Thornasterol A como aglicona. Asimismo asignaron todos los carbonos mediante experimentos COSY heteronucleares. Los resultados están en total acuerdo con los informados previamente para esos compuestos.

Si bien la espectroscopía de RMN ^1H es una fuente importante de información para la determinación estructural de oligosacáridos, los espectros de RMN ^{13}C son determinantes. Los efectos de glicosidación, que describen la diferencia de desplazamiento químico de un dado carbono en un monosacárido sustituido respecto al monosacárido libre, son indicativos del entorno y bien conocidos. Así, por ejemplo, el desplazamiento a campos bajos de la señal del C-3 sustituido del monosacárido unido directamente a la aglicona es característico en los espectros de todas las asterosaponinas. Esta señal se observa a δ 90-91 ppm, a campos más bajos respecto de lo esperado para el C-3 glicosidado de β -glucopiranososa o β -quinovopiranososa, los cuales aparecen a δ 87-88,5 ppm.

Quinovosa y fucosa pueden distinguirse por RMN ^{13}C dado que el metilo de quinovosa se observa en el rango de δ 17,7-18,3 ppm, mientras que el de fucosa a valores de δ 16,6-17,0 ppm. Además, la señal del metileno C-5 de la xilosa se observa claramente en RMN ^{13}C o través de una secuencia DEPT y su desplazamiento químico es diagnóstico respecto de la sustitución de C-4. En

xilosa no sustituida en C-4 se observa a δ 67,0 ppm, mientras que se desplaza a δ 64,0 ppm como consecuencia de la glicosidación en C-4 (**tabla 4**).

El Ophidianósido F **{3}** (**fig. 21**) es la asterosaponina mayoritaria en *Cosmasterias lurida*. Este compuesto posee 3 β -sulfato-Thornasterol A como aglicona y la misma secuencia de azúcares que el Cosmasterósido A.

En el espectro FAB de iones positivos del Ophidianósido F se observan las especies que corresponden al ión molecular cationizado a m/z 1259 [MNa + Na]⁺, 1275 [MNa + K]⁺ y 1253 [MK + H]⁺. Si se agregan sales de potasio a la matriz es posible observar el ión molecular cationizado de m/z 1291 [MK + K]⁺. Entre los fragmentos de azúcares se observan las señales del pentasacárido a m/z 741 y m/z 725, el tetrasacárido a m/z 595 (741 - 146) y m/z 579 (725 - 146), el trisacárido resultante por pérdida de la quinovosa ramificada a m/z 449 (595 - 146) y m/z 433 (579 - 146) y los fragmentos del disacárido (Fuc + Xil) a m/z 317 (449 - 132) y m/z 301 (433 - 132). En el espectro FAB de iones negativos se observa el ión cuasimolecular de m/z 1213 [M]⁻ y el ión de m/z 1113 por pérdida de la cadena lateral a partir de 1213.

Las señales del espectro de RMN ¹³C (**tabla 3**) revelan la presencia de una aglicona sulfatada en C-3 (δ_c 77,6 ppm) y glicosidada en el C-6 (δ_c 80,3 ppm), estructura común en saponinas de asteroideos. Por metanólisis ácida y posterior análisis por CGL se obtienen quinovosa, xilosa y fucosa en relación 2:2:1. El esquema de fragmentación obtenido en el espectro FAB de iones positivos sugiere la presencia de la ramificación en la unidad de xilosa, el segundo monosacárido a partir de la aglicona. Las uniones interglicosídicas son β según se establece por los valores de δ de RMN ¹³C de los carbonos anoméricos (**tabla 4**) y las constantes de acoplamiento (J) de los protones anoméricos en el espectro RMN ¹H (**fig. 20**). Por otra parte, en el espectro RMN ¹³C se observa la señal a δ

64,3 ppm (**tabla 4**) correspondiente al C-5 de una xilosa 4-O sustituida. La señal de carbono anomérico a campos relativamente altos (δ 101,9) se explica por el efecto de sustitución del C-2 de la xilosa II. Esta unión glicosídica del C-2 se evidencia además por el desplazamiento de cerca de 10 ppm (efecto β) a δ 84,2 ppm del C-2 de la xilosa II.

Por hidrólisis enzimática con *Charonia lampas* el Ophidianósido F rinde el tetraglicósido Cosmasterósido C debido a la pérdida de la fucosa terminal, según se demuestra por comparación de los espectros de RMN ^1H y FAB. El espectro FAB de iones positivos del producto de hidrólisis presenta el ión molecular protonado a m/z 1091 $[\text{M} + \text{H}]^+$ y el fragmento de m/z 959 (1091 -132) por pérdida de xilosa a partir de 1091.

Los espectros de RMN ^{13}C y RMN ^1H (parte experimental) de **{3}** resultan superponibles a los del Ophidianósido F aislado de *Ophidiaster ophidianus*⁸⁸.

En el espectro de RMN ^1H del Cosmasterósido A **{1}** (**fig. 22**) se observan señales de los protones de la aglicona idénticos a los de Ovarian-Asterosaponin-4 (OV-4) ((20S)-5 α -colest-9(11),24-dieno-3 β ,6 α ,20-triol 3 β -sulfato) aislada de *Asterias amurensis*⁹² (**fig. 23**).

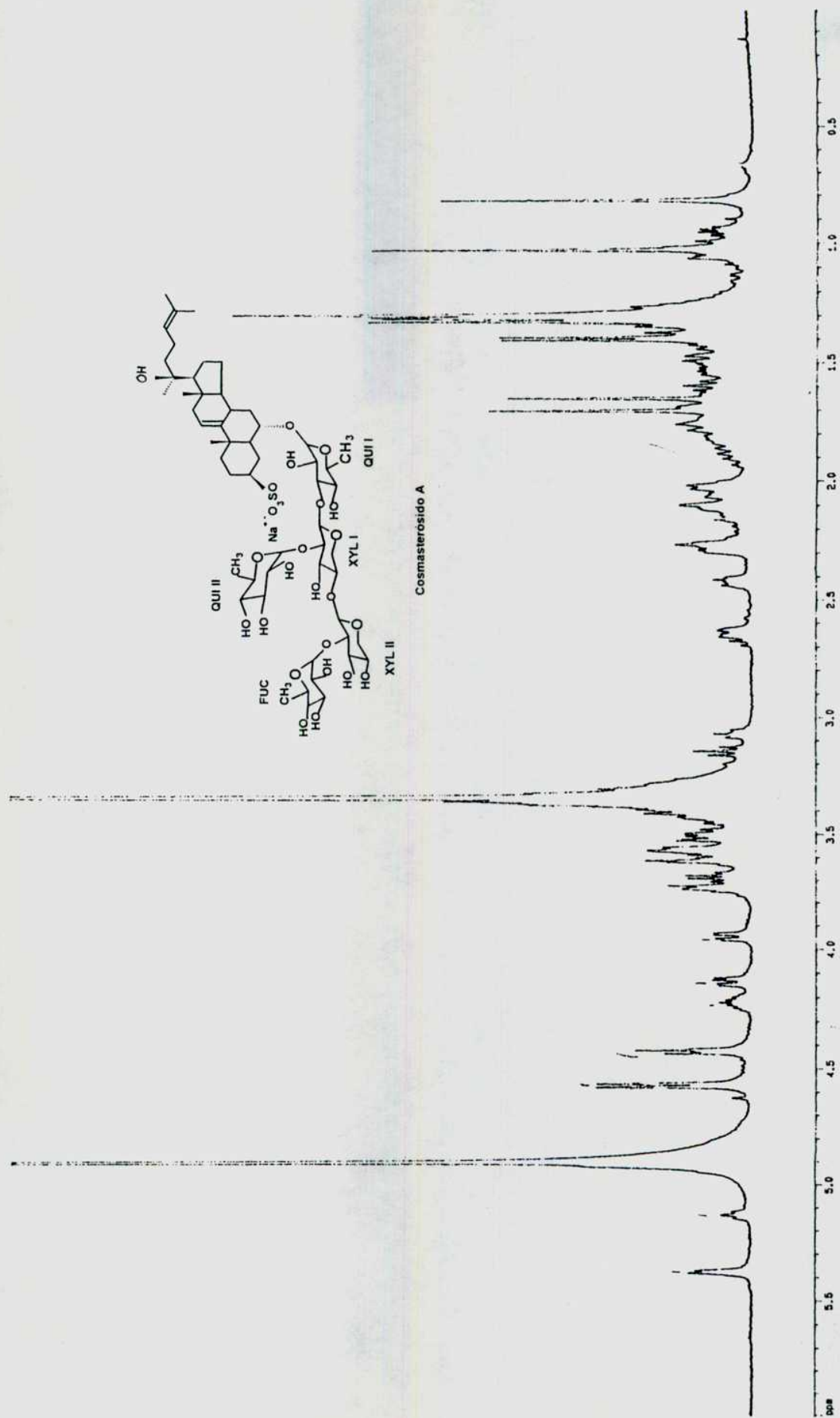


Fig. 22 - RMN ^1H (500 MHz) del Cosmasterósido A {1}

Se destacan las señales de H-24 a δ 5,13 y los dos singuletes a δ 1,64 y 1,70 ppm correspondientes a los metilos C-26 y C-27, típicos de la cadena de isopropenilo. Estas señales permiten distinguir la cadena lateral de la aglicona del Cosmasterósido A de la del Thornasterósido A (**tabla 2**).

Tabla 2. Señales de RMN ^1H , 500 MHz (CD_3OD) de los protones de la aglicona esteroidal de los glicósidos {1} A y {2}, {3}, {4}, {5} y {6} B.

Entre paréntesis J (Hz)

Hidrógeno	A	B
3	4,22m	4,22m
11	5,38sa	5,37sa
18	0,82s	0,81s
19	1,02s	1,02s
21	1,31s	1,37s
22		2,62cAB(15) 2,42d(7,5)
24	5,13t(6,5)	
26	1,64s	0,93d(7)
27	1,70s	0,94d(7)

Además, las señales del espectro de RMN ^{13}C de la aglicona del Cosmasterósido A {1} coinciden con las de (OV-4) (**tabla 3**) y se diferencian claramente de los carbonos de la cadena lateral del Thornasterol A (B), la aglicona de las otras asterosaponinas aisladas de *C. lurida*. Las señales a δ 77,5 (C-3) y 80,3 ppm (C-6) confirman que el oligosacárido está unido al C-6 y el grupo sulfato se encuentra en el C-3 de la aglicona, como ocurre en general en las asterosaponinas descriptas.

Tabla 3. RMN ^{13}C (62,9 MHz, piridina- d_5) de las agliconas esteroidales de los compuestos {1} (A) y {2}-{6} (B) y Ovarian asterosaponin-4⁹² como compuesto de referencia para la aglicona A.

Carbono	Agliconas esteroidales		
	Comp. de ref.	A	B
1	36,2	35,9	35,9
2	29,6	29,3	29,3
3	77,9	77,5	77,6
4	30,9	30,6	30,7
5	49,6	49,2	49,5
6	80,7	80,3	80,3
7	41,8	41,4	41,5
8	35,6	35,2	35,3
9	145,8	145,3	145,4
10	38,5	38,2	38,2
11	116,9	116,7	116,6
12	42,8	42,4	42,4
13	41,8	41,4	41,5
14	54,3	53,9	53,9
15	23,6	23,4	23,2
16	25,4	25,1	25,1
17	59,1	58,6	59,5
18	13,6	13,5	13,5
19	19,4	19,1	19,2
20	74,0	73,6	73,7
21	25,8	25,6	26,9
22	44,7	44,5	54,8
23	23,2	22,9	211,7
24	125,9	125,6	53,9
25	130,8	130,6	24,3
26	26,4	26,1	22,4
27	17,7	17,8	22,5

Por otra parte, el espectro RMN ^1H de {1} muestra las señales de los protones anoméricos a δ 4,42 (d, $J=6,3$ Hz, xil I y xil II) y 4,57 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, qui I, qui II, y fuc), un doblete a δ 1,40 ($J = 6,3$ Hz) correspondiente al metilo de la D-quinovosa II y dos dobletes a $\delta = 1,29 - 1,31$ superpuestos con la señal del metilo 21, que corresponden a los metilos de D-quinovosa I y D-fucosa.

En el espectro FAB de iones negativos de {1} se observa el anión cuasimolecular a m/z 1197 $[\text{M} - \text{H}]^-$ e iones correspondientes a fragmentos de m/z 1051 $[\text{M} - 146]^-$ y 919 $[\text{M} - 146 - 132]^-$, correspondientes a las pérdidas consecutivas de fucosa y xilosa. Una confirmación del peso molecular del Cosmasterósido A {1} se logró mediante el agregado a la matriz (glicerol) de diferentes cationes y el estudio de los iones moleculares cationizados obtenidos en el espectro FAB de iones positivos en cada caso. Por agregado de sales de sodio se obtuvo para el Cosmasterósido A el ión molecular cationizado $[\text{MNa} + \text{Na}]^+$ de m/z 1248, por agregado de sales de K^+ , se obtuvo $[\text{MK} + \text{K}]^+$ de m/z 1277 y por agregado de CO_3Li se obtuvo $[\text{MH} + \text{Li}]^+$ de m/z 1206. Por último, el agregado de ácido m-nitrobenzoico (MNBA) a la matriz permitió obtener el ión $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 1199.

Por metanólisis del Cosmasterósido A {1}, sililación y análisis por CGL se detectó fucosa, xilosa y quinovosa en relación 1:2:2. Esta composición de azúcares es idéntica a la encontrada en los Ophidianósidos C y F, los componentes mayoritarios en *Ophidiaster ophidianus* y *Hacelia attenuata*⁸⁸. Si se realiza la comparación de los datos de RMN ^{13}C de la parte glicosídica del Cosmasterósido A y el Ophidianósido F⁹³ (tabla 4) se comprueba que se trata de la misma secuencia de azúcares en ambos casos. Por tanto el Cosmasterósido A es caracterizado como la sal de sodio de (20S)-6 α -O- $\{\beta$ -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopiranosido $\}$ 5 α -colest-20-hidroxi-9(11),24-dieno 3 β -sulfato.

El Cosmasterósido B {2}, la segunda saponina novedosa, es un pentaglicósido que contiene Thornasterol A como aglicona (5 α -colest-3 β ,6 α ,20S-trihidroxi-9(11)-en-23-ona) según se estableció por los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C (tablas 2 y 3) de la saponina intacta. El espectro FAB de iones negativos de {2} muestra el ion cuasimolecular a m/z 1229 [M^-] e iones correspondientes a fragmentos de m/z 1129 [M^- -cadena lateral] y a m/z 938 (1129-146), 851 (938-132), 573 (851-132-146) y 411 (573-162) que indican la pérdida secuencial de fucosa (o quinovosa), xilosa, xilosa y quinovosa (o fucosa) y glucosa, respectivamente. La pérdida de 162 unidades de masa (glucosa) a partir del fragmento del pentasacárido de m/z 757 y m/z 741 en el espectro FAB de iones positivos para dar fragmentos de m/z 595 y 579 respectivamente, indica que la glucosa está directamente unida a la aglicona. Por hidrólisis ácida en metanol de {2}, sililación y análisis por CGL se demostró la existencia de quinovosa, fucosa, xilosa y glucosa en relación 1:1:2:1. El espectro de RMN ^1H de {2} muestra 4 dobletes correspondientes a protones anoméricos ($J = 6,5$ Hz) a δ 4,42 (xil I y xil II), δ 4,45 (fuc), δ 4,56 y δ 4,57 (qui y glc). Se observan además dos dobletes a δ 1,31 ($J = 6,5$ Hz) y δ 1,40 ($J = 6,5$ Hz) de los metilos de fucosa y quinovosa respectivamente, y dos dobles dobletes a δ 4,13 ($J=12 ; 4$ Hz) correspondiente al hidrógeno 5' de la xilosa I (H-5'ec) y a δ 3,94 ($J=12 ; 4$ Hz) del H-5'ec. de la xilosa II.

Las uniones interglicosídicas en {2} se deducen a partir del espectro de RMN ^{13}C (tabla 4) y su comparación con los correspondientes del Cosmasterósido A {1} y del Ophidianósido F {3}. La cadena de oligosacárido en estos dos ejemplos difiere de la del Cosmasterósido B {2} sólo en la D-quinovosa unida directamente al C-6 del esteroide, que es reemplazada por D-glucosa (δ C-6' 62,3 ppm) en el Cosmasterósido B. Por otra parte existen algunos

ejemplos de saponinas que contienen D-glucosa unida a C-6 del esteroide, como los Luidiaglicósidos C y D⁹² y el Marthasterósido B⁹⁴ (fuc(1→2)-qui-(1→4)-[qui(1→2)]-qui(1→3)-glc(1→6)-aglicona). La comparación con estos compuestos y la presencia de la señal a δ 90,9 en el espectro RMN ¹³C permite establecer que el C-3' de la glucosa está unido al carbono anomérico de D-xilosa.

Por hidrólisis enzimática del Cosmasterósido B con una mezcla de glicosidasas (*Charonia lampas*) se obtuvo el trisacárido {2a}. El espectro FAB de iones positivos de éste presenta el ión molecular cationizado con m/z 998 [M⁺+H+Na] y fragmentos de m/z 877 [M⁺+H - cadena lateral], 599 (877-146-132), correspondiente a la pérdida de quinovosa y xilosa.

Con toda esta información, el Cosmasterósido B queda definido como la sal de sodio de (20S)-6 α -O-{\beta-D-fucopiranosil-(1→2)-\beta-D-xilopiranosil-(1→4)-[\beta-D-quinovopiranosil-(1→2)]-\beta-D-xilopiranosil-(1→3)-\beta-D-glucopiranosido} 5 α -colest-20-hidroxi-9(11)-en-23-ona-3 β -sulfato {2} (fig. 24).

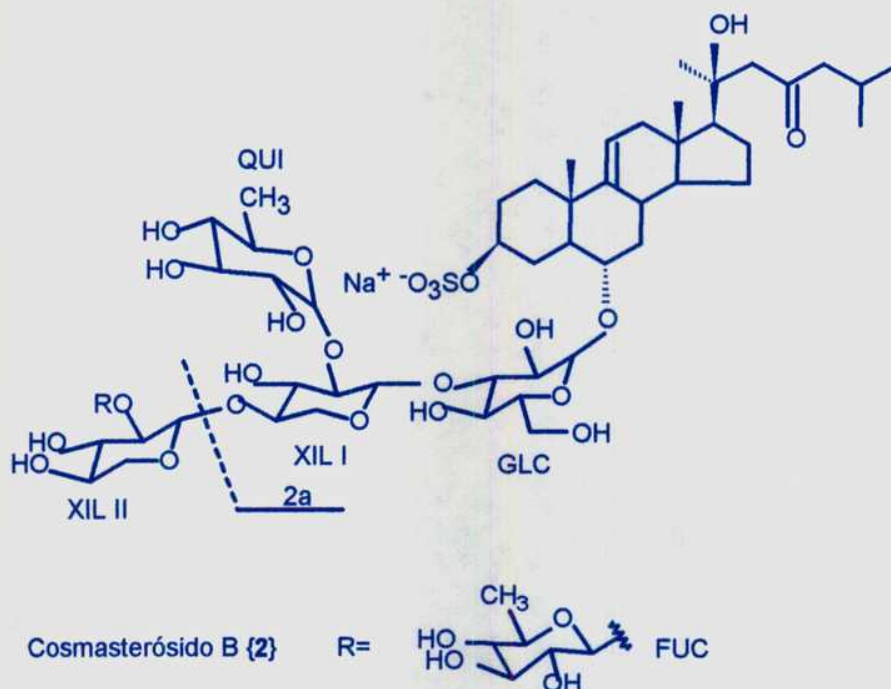


Fig. 24 - Cosmasterósido B {2}

Un tercer compuesto novedoso es el tetraglicósido Cosmasterósido C {4}. Por metanólisis ácida de {4}, sililación y análisis por CGL se obtuvo xilosa y quinovosa en relación 1:1. El espectro de RMN ^1H muestra, además de las señales comunes del Thornasterol A, la presencia de cuatro dobletes de protones anoméricos a δ 4,35 (1H), δ 4,42 (1H), δ 4,57 (1H) y δ 4,59 (1H) con valores de J en el rango 6,6 a 7,3 Hz, y dos dobletes a δ 1,30 (5,7 Hz) y δ 1,39 (6,2 Hz) correspondientes a los metilos de D-quinovosa I y II respectivamente. Comparando con el Ophidianósido F, éste presenta una señal adicional a δ 1,32 (J = 6,2 Hz) del grupo metilo de D-fucosa y dos dobletes a δ 4,42 (2H) y δ 4,57 (3H) en la zona de los protones anoméricos. Se observan además dos dobles dobletes a δ 4,09 (J = 11,5; 4,5 Hz) y 3,92 (J = 10,5; 5 Hz) correspondientes al protón ecuatorial de las xilasas I y II e indicando la presencia de una única xilosa 4-O sustituida. El valor del carbono anomérico y del carbono 2' de la xilosa II (δ 103,8 y 74,0) y su comparación con los correspondientes al Ophidianósido F⁹³ (δ 101,9 y 84,2) indican la posición terminal de la xilosa II. Las uniones interglicosídicas se deducen a partir de los datos de RMN ^{13}C del Ophidianósido F⁹³ y del metil β -D-xilopiranosido⁹⁵. El espectro FAB de iones negativos de {4} (fig. 27) muestra el anión molecular a m/z 1067 y fragmentos a m/z 967 ([M⁻ - cadena lateral] y m/z 835 (967-132) por pérdida de la xilosa terminal. En el espectro FAB de iones positivos (fig. 25) se observan los iones moleculares cationizados [MNa + Na]⁺ de m/z 1113 y [MK + K]⁺ de m/z 1129 y un fragmento de m/z 993 [M - SO₄NaH].

Por hidrólisis enzimática del Ophidianósido F con *Charonia lampas* se obtuvo el Cosmasterósido C {4} según se demuestra por comparación de los espectros de RMN ^1H y FAB⁺. El Cosmasterósido C es entonces la sal de sodio de (20S)-6 α -O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-

xilopiranosil-(1→3)-β-D-quinovopiranósido} 5α-colest-20-hidroxi-9(11)-en-23-ona
3β-sulfato {4}.

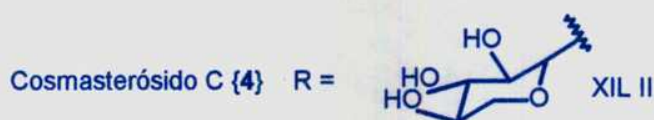
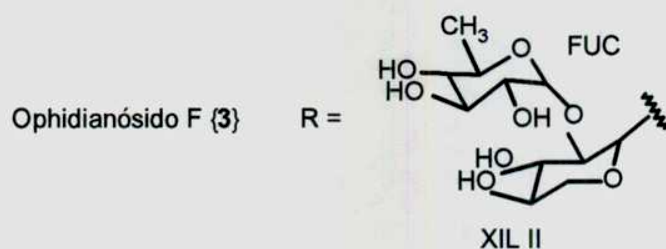
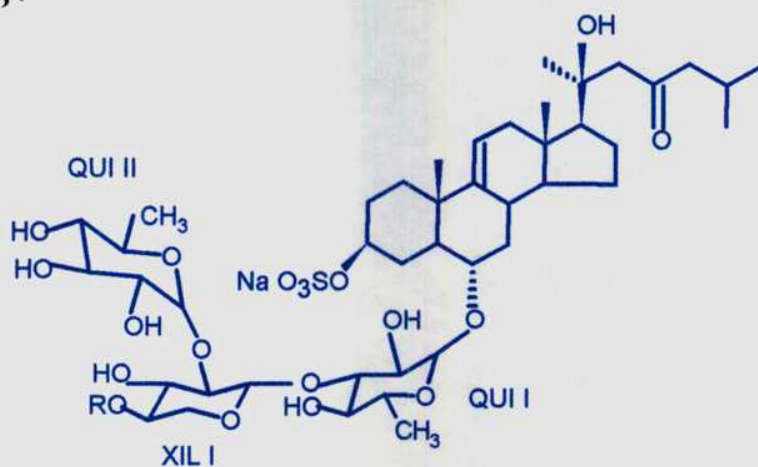


Fig. 25 - Asterosaponinas de *C. lurida*: Ophidianósido F, Cosmasterósido C y Forbésido H

Tabla 4. RMN ^{13}C (62,9 MHz, piridina- d_5) de la cadena de azúcares de asterosaponinas.

Carbono	Compuesto			
	1 y 3	4	6	2
	Qui I	Qui I	Qui I	Glc
1	105,0	105,1	105,1	105,2
2	74,1	74,1	74,1	75,0
3	90,1	90,4	90,7	90,9
4	74,4	74,4	74,4	69,5
5	71,9	72,0	72,0	76,2
6	17,8	17,9	17,9	62,3
	Xil I	Xil I	Xil I	Xil I
1	104,3	104,3	104,8	104,6
2	82,1	82,1	82,9	82,2
3	75,2	75,2	77,5	75,5
4	78,1	78,0	70,4	78,2
5	64,3	64,4	67,0	64,3
	Qui II	Qui II	Qui II	Qui
1	105,0	104,8	105,0	105,0
2	75,5	75,5	75,5	75,5
3	76,7	76,7	76,8	76,7
4	76,1	76,1	76,2	76,2
5	73,6	73,5	73,6	73,6
6	18,4	18,4	18,5	17,9
	Xil II	Xil II		Xil II
1	101,9	103,8		102,1
2	84,2	74,0		84,4
3	77,3	76,7		77,4
4	70,3	70,8		70,4
5	66,7	67,3		66,8
	Fuc			Fuc
1	106,8			106,9
2	71,9			72,0
3	74,8			75,0
4	73,6			73,7
5	72,5			72,5
6	17,1			17,2

File:SELDES6 Ident:130 139-96 103-103 Win 100PPM Acq: 5-MAR-1994 10:44:14 +18:19 Cal:SELDES6
ZAB-SEQ FAB+ Magnet BpM:1113 BpI:168080 TIC:1920868 Flags:NORM

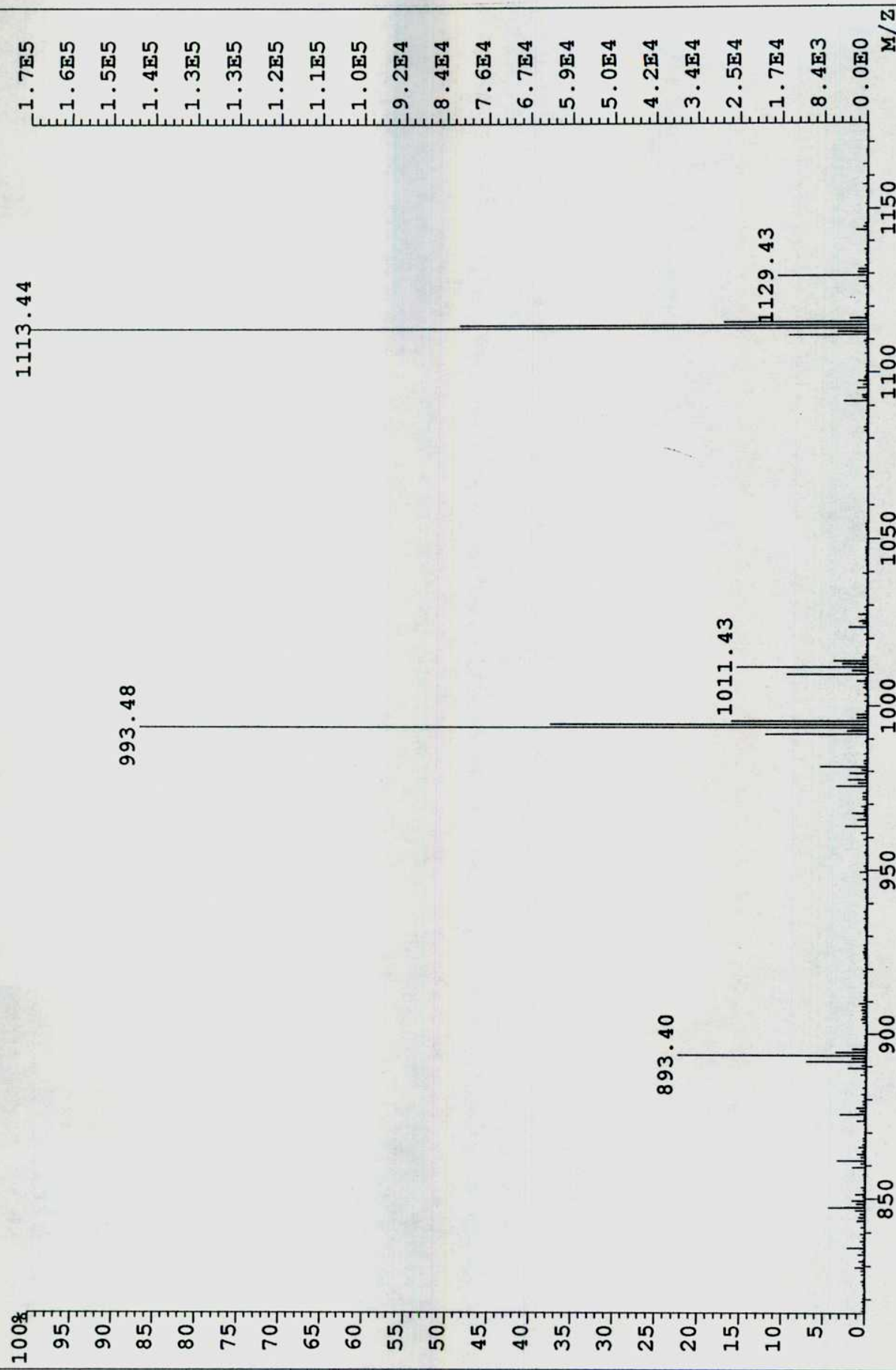


Fig. 26 - FAB⁺ del Cosmasterósido C

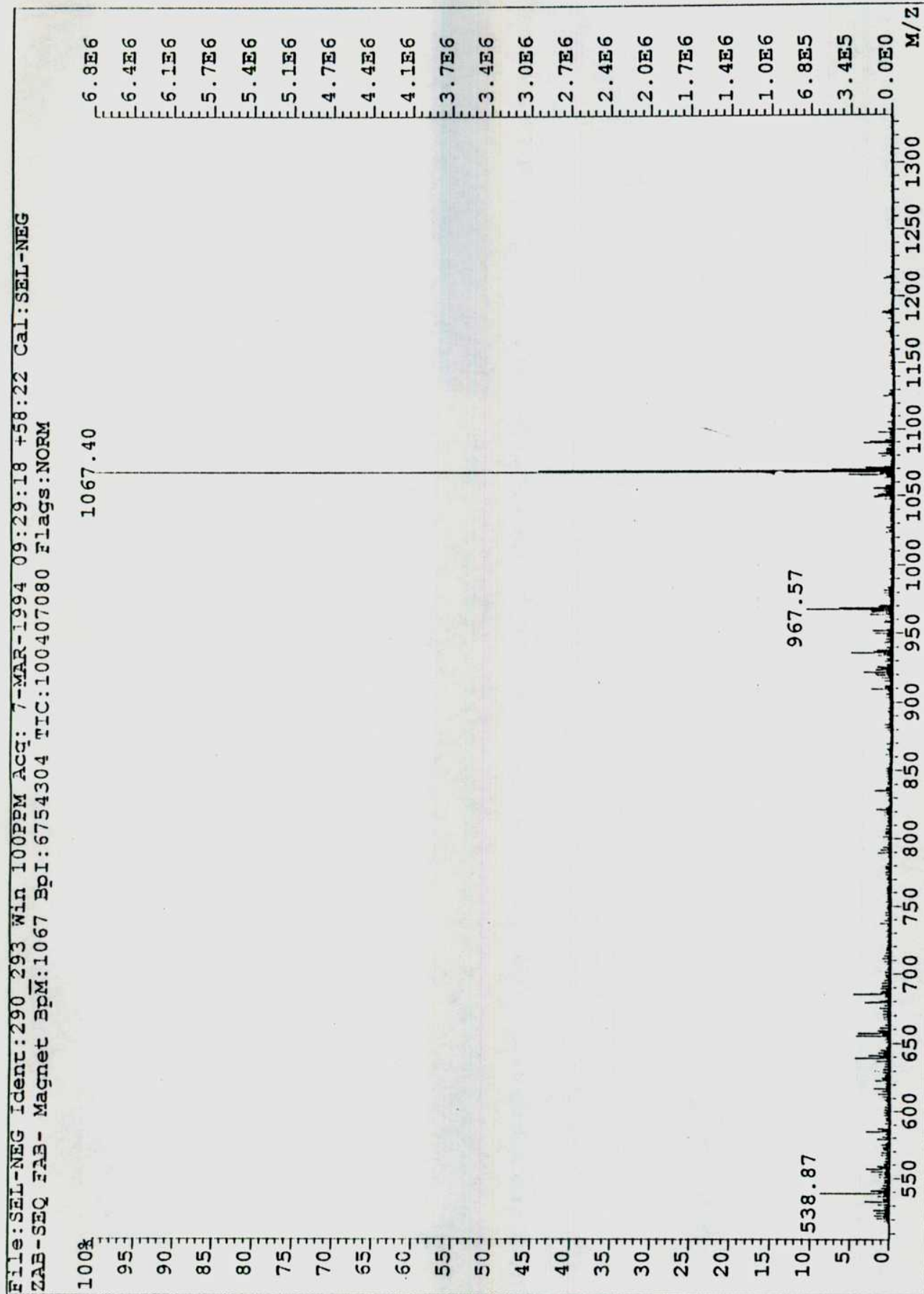


Fig. 27 - FAB del Cosmasterósido C

UBA05 1 (2.528) Sm (SG. 2x0.75)

Scan ES-
4.750

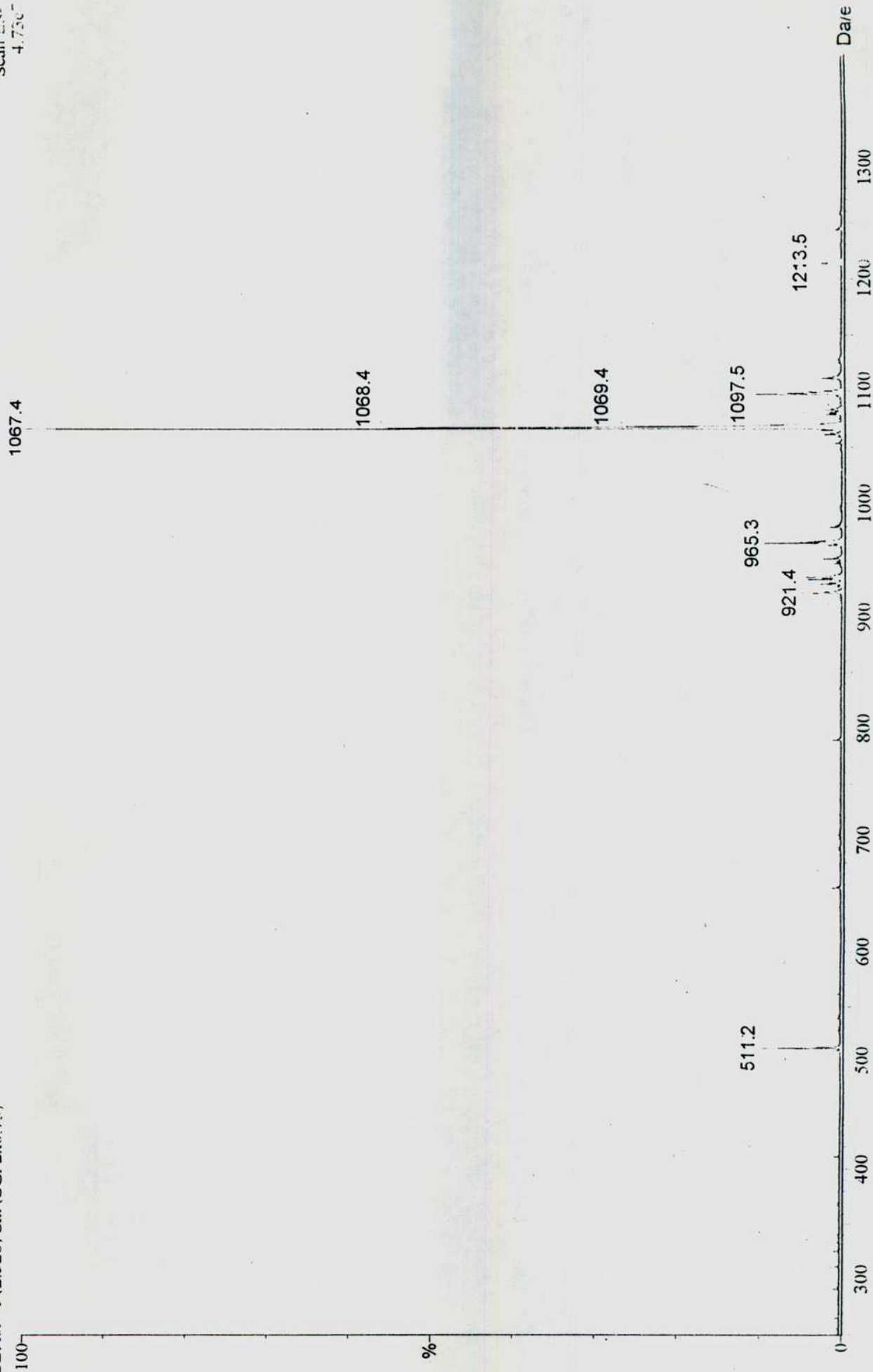


Fig. 28 - ESP del Cosmasterósido C (modo iones negativos).

El Cosmasterósido D {5} (fig. 29), otro tetraglicósido de estructura novedosa corresponde al compuesto que se obtiene por eliminación de la fucosa terminal del Cosmasterósido B {2}. Presenta en su espectro FAB de iones negativos el anión molecular a m/z 1083 y fragmentos a m/z 951 ($1083 - 132$) y 673 ($951 - 132 - 146$) que corresponden a la pérdida secuencial de xilosa y xilosa + quinovosa.

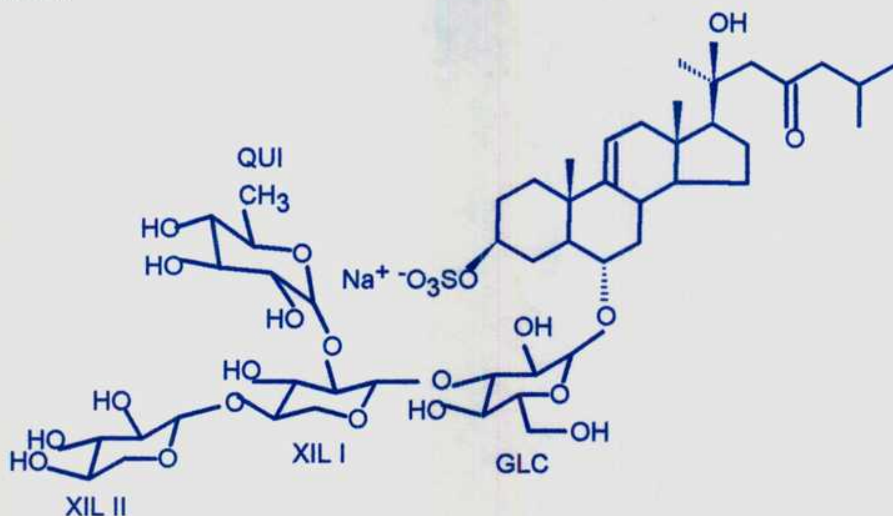


Fig. 29 - Cosmasterósido D {5}

Por metanólisis ácida de {5}, sililación y análisis por CGL se obtuvo quinovosa, xilosa y glucosa en relación 1:2:1. En el RMN ^1H de {5} aparecen las señales de la aglicona correspondientes al Thornasterol A (tabla 2, aglicona B) y las señales de los protones anoméricos a δ 4,59 (1H), δ 4,57 (1H), δ 4,42 (1H), δ 4,35 (1H), dobletes con valores de J de 7,0 a 7,5 Hz; un doblete a δ 1,39 (5,7 Hz) asignado al grupo metilo de D-quinovosa y dos dobles dobletes a δ 4,08 (12 ; 4 Hz) del H-5'ec de la xilosa I y otro a δ 3,91 (12 ; 4 Hz) del H-5'ec. de la xilosa II.

Los Cosmasterósidos C{4} y D{5} constituyen unos de los pocos ejemplos de tetraglicósidos aislados de estrellas. Otros son el Forbésido F⁹⁰ de *Asterias Forbesi* colectada en la Bahía de Fundy, Canadá y el Santiagósido⁹⁶ de la estrella antártica *Neosmilaster georgianus*, ambas del Océano Atlántico.

El compuesto {6}, aislado de *Cosmasterias lurida* presenta en su espectro FAB de iones negativos el ión cuasimolecular a m/z 935 $[M]^-$, y los iones a m/z 835 $[M - \text{cadena lateral}]^-$, m/z 689 (835 - 146) $[M - \text{Qui}]^-$, m/z 557 (689 - 132) $[M - \text{Xil}]^-$, m/z 411 (557 - 146) $[M - \text{Qui}]^-$ por pérdida consecutiva de quinovosa II, xilosa y quinovosa I.

La confirmación de la cadena de azúcares de {6} se establece por la presencia en el espectro de RMN ^1H de 3 señales de hidrógenos anoméricos a δ 4,42 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz), 4,54 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz) y 4,56 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz) correspondientes a xilosa, quinovosa I y quinovosa II respectivamente, así como las dos señales de los metilos de 6-desoxihexosas a δ 1,29 (d, 3H, $J = 5,8$ Hz, Me-5' de quinovosa I) y 1,39 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz, Me-5' de quinovosa II). Se observa además una señal a δ 3,91 (dd, 1H, $J = 11,1; 4,5$ Hz) correspondiente al H-5ec de una xilosa con el C-4 no sustituido.

Los espectros RMN ^1H y ^{13}C del compuesto {6} resultan idénticos a los del Forbésido H aislado de *Asterias forbesi*⁹⁰.

El triglicósido Forbésido H constituye uno de los pocos ejemplos de triglicósidos aislados de asteroideos. Otros son los Sepositósidos A, B, C y D (pág. 17) aislados de la estrella *Echinaster sepositus*.

1.2 - IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES ENANTIOMÉRICOS COMO SUS 1-AMINO-1-DESOXIALDITOLAS DIASTEROMÉRICOS

Es sabido que los azúcares más comunes en asterosaponinas son D-fucosa, D-quinovosa, D-xilosa, D-galactosa, y D-glucosa. Sin embargo a menudo se presupone que la configuración es la usual para cada uno de ellos sin una prueba directa. Para determinar la configuración, uno de los métodos más interesantes y prácticos implica convertir los enantiómeros en diastereómeros mediante un reactivo quiral e intentar la separación de los mismos por cromatografía gaseosa.

El primer método y el más utilizado hasta el momento, fue desarrollado en 1978 por los grupos de Vliegthart¹²³ y Lindberg¹²⁴. Consiste en transformar los azúcares enantioméricos mediante la reacción con un alcohol quiral (2-octanol ó 2-butanol) en los alquilglicósidos diastereoméricos. Una vez derivatizados (acetilación o trimetilsililación) se logran buenas separaciones por cromatografía gas-líquido. Hoy este método es el más usual para la determinación de configuraciones y ha desplazado, en ese sentido a la medida de la rotación óptica o los métodos enzimáticos. Sin embargo, la volatilidad del 2-octanol es baja y por otro lado, cada azúcar da lugar a tres o cuatro picos correspondientes a los anómeros α y β de las formas furanósicas y piranósicas. Por lo tanto, la interpretación de los resultados no es sencilla cuando el oligosacárido contiene varias unidades.

Otra posibilidad es derivatizar los azúcares con una amina quiral, empleando la reacción de aminación reductiva, que produce un sólo derivado para cada monosacárido. Se hace reaccionar el azúcar con la amina quiral para formar la imina, que es reducida *in situ* en presencia de cianoborohidruro de sodio para dar el correspondiente 1-amino-1-desoxialditol. Los productos de la reacción

se convierten luego en sus derivados acetilados o trimetilsililados y se analizan por CGL. Se trata de un método sencillo que elimina la multiplicidad de picos.

Oshima *et al*¹²⁵ emplearon (S)- α -metilbencilamina como amina quiral pero obtuvieron superposiciones en la región de las pentosas y 6-desoxihexosas.

Cases y colaboradores^{126, 127} utilizaron 1-amino-2-propanol como amina quiral, y estudiaron las condiciones óptimas de reacción para obtener los diastereómeros libres de productos secundarios. Así por ejemplo, la condensación de D-galactosa con 1-amino-2-propanol racémico y posterior reducción de la imina produce ambos diastereómeros en cantidades equivalentes más un exceso del aminoalcohol. Si se utiliza como amina α -metilbencilamina racémica, uno de los diastereómeros prevalece. Los derivados acetilados de los 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino)-alditales se resuelven por CG dando dos picos.

Los parámetros óptimos para la reacción de aminación reductiva son¹²⁷:

- a - una relación inicial aminoalcohol:azúcar 5:1.
- b - un pH cercano a 4.
- c - un descenso de la polaridad del medio incrementa los rendimientos, en metanol anhidro el rendimiento de amino alditales es cercano a 85%.
- d - un exceso de NaBH_3CN mayor al 10% (respecto al azúcar) baja el rendimiento de la reacción.
- e - el agregado de ácido acético glacial al metanol anhidro produce un rendimiento cuantitativo de productos.
- f - El rendimiento es prácticamente constante trabajando desde 65 a 85 °C de 1 a 4 horas, o a temperatura ambiente durante 24 hs (85-100%).

Por lo tanto, se utilizan como condiciones óptimas 1 hora de reacción a 65° C con una relación molar 5:1:1,1:10 de 1-amino-2-propanol:azúcar: NaBH_3CN : AcOH en metanol.

Se prepararon los derivados de los patrones de D-Qui, D-Xil, D-Glc y L-Fuc con (S)-1-amino-2-propanol y con el amino-alcohol racémico. Se analizaron por CGL ambos tipos de patrones separadamente, utilizando una columna ULTRA-2. Comparando los resultados obtenidos con la amina quiral (S)-1-amino-2-propanol y con la mezcla racémica, se asignaron los tiempos de retención para los azúcares de ambas series enantioméricas, siendo los derivados producidos por la amina (R) equivalentes a aquéllos producidos por el enantiómero del azúcar con la amina (S). En realidad sólo son cromatográficamente equivalentes, ya que son enantiómeros entre sí. Se logró una buena resolución de los derivados de cada azúcar enantiomérico, excepto en el caso de glucosa, ya que los aminoalditoles acetilados de glucosa preparados con el aminoalcohol racémico dan una única señal en CGL. Los correspondientes a la quinovosa, sin embargo se resuelven aceptablemente (**fig. 30**). La utilidad del método para 6-deoxiglucosa (quinovosa) no estaba descrita en el trabajo original¹²⁷.

Se aplicó la metodología descrita anteriormente a la mezcla de monosacáridos libres obtenidos por hidrólisis ácida del Cosmasterósido A (parte experimental) y se compararon los tiempos de retención de los derivados de los patrones con los obtenidos con la mezcla producto de la hidrólisis (**fig. 30**). Se confirmó la asignación por coinyección del derivado de cada D-monosacárido con la mezcla de hidrólisis, derivatizados ambos con el (S) amino alcohol.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que los monosacáridos presentes en el Cosmasterósido A pertenecen todos a la serie D.

Tabla 10 - Tiempos de retención de los derivados de azúcares

	D	L	Cosmasterósido A	r^a	$r_{D/L}^b$
Fuc	34,94	35,16	34,97	1,006	1,1
Qui	35,40	35,14	35,43	1,007	1,1
Xil	36,17	36,39	36,19	1,006	1,3

^a factor de separación, ^b relación de áreas de los picos correspondientes a ambos enantiómeros

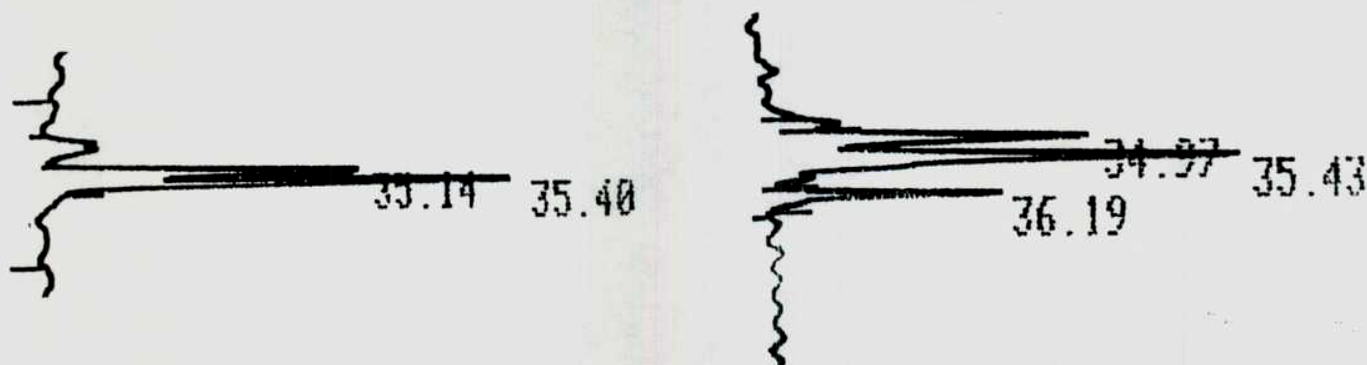


Fig. 30 - Cromatogramas C.G.L. de los aminoalditoles acetilados
correspondientes a quinovosa preparados con el amino-álcohol racémico y del
producto de hidrólisis con el (S) 1-amino-2-propanol.

1-3 MONOGLICÓSIDOS ESTEROIDALES DE***Cosmasterias lurida* (Philippi 1858)** **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN**

El análisis por ccd de las fracciones de Sephadex LH60 permitió identificar los glicósidos de esteroides polihidroxilados en los tubos 66-100. (**Esquema 1, pág. 29**)

La fracción que reveló la presencia de glicósidos fue purificada por cromatografía en columna de sílicagel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:30:0,5)), obteniéndose dos fracciones (1 y 2). Cada una de ellas fue repurificada por medio de sucesivas columnas de Sephadex LH20 (MeOH) y de fase reversa Davisil C-18 ($35\text{-}75\mu$) (MeOH - H_2O (65:35)). Se aislaron el Pycnopodiósido C (**fig. 31**) (27 mg) de la fracción 1, y los Luridósidos A (18 mg) (**fig. 33**) y B (10 mg) (**fig. 34**) de la fracción 2. Cada compuesto muestra una única mancha en ccd en fase reversa (C-18) (MeOH- H_2O (65:35)) y un pico en CLAR (MeOH- H_2O (60:40)), t.r. del Luridósido A {7} = 12,5 min, t.r. del Luridósido B {8} = 15,0 min.

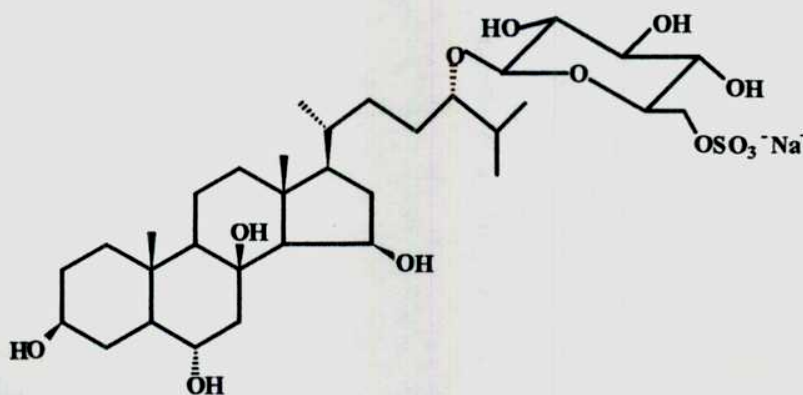


Fig. 31 - Pycnopodiósido C {9}

De los 3 esteroides polihidroxilados monoglicosidados aislados de *Cosmasterias lurida* en este trabajo, dos resultaron novedosos, los **Luridósidos A**

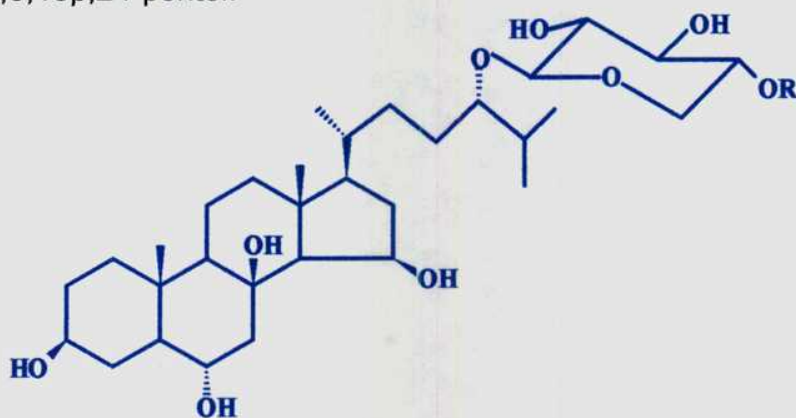
{7} y B {8}. El **Pycnopodiósido C {9}** fue aislado previamente de *Pycnopodia helianthoides*⁹⁷.

Los tres monoglicósidos aislados de *Cosmasterias lurida* contienen la misma aglicona. El Attenuatósido A-I aislado de la estrella *Hacelia attenuata*⁹⁸ es el primer ejemplo que contiene una aglicona del tipo 5 α -colest-3 β ,6 α ,8,15 β ,24(S)-pentol y un monosacárido unido a C-24 del esteroide (2-O-metil- β -D-xilopiranosil-(1-2)-L-arabinofuranosa). Otros ejemplos fueron aislados de *Astropecten indicus*⁵⁷, *Halityle regularis*⁹⁹, *Porania pulvillus*¹⁰⁰, *Sphaerodiscus placenta*¹⁰¹, *Pycnopodia helianthoides*⁹⁷ y *Pisaster giganteus*¹⁰².

El Pycnopodiósido C **{9}** (**fig. 31**) es el glicósido 24-O- β -glucopiranosil-6'-sulfato de (24S)-5 α -colest-3 β ,6 α ,8,15 β ,24-pentol. El espectro de RMN ¹H y ¹³C (**tabla 5**) del Pycnopodiósido C muestra las señales de la aglicona (δ 3,55 (1H, m, H-3 α); δ 3,71 (2H, m, H-6 β e H-24); δ 4,44 (1H, ta, J = 5,5; H-15 α) en coincidencia con las observadas en el espectro de (24S)-5 α -colest-3 β ,6 α ,8,15 β ,24-pentol aislado como esteroide libre de *Gomophia watsoni*⁵⁶, excepto las señales de los metilos del grupo isopropilo en **{9}**, los cuales aparecen como un doblete a δ 0,96 ppm, mientras que en el espectro del esteroide aparecen como dobletes separados a δ 0,92 y 0,94 ppm. Esto sugiere la ubicación del azúcar en C-24. En RMN ¹H se observan además las señales del metileno -CH₂O- de la glucosa a δ 4,34 (dd, J = 2,5; 11,5 Hz) y a δ 4,18 (dd, J = 5; 11,5 Hz). En el espectro RMN ¹³C de **{9}** se observa la señal del C-6' de la glucosa desplazada a δ 68,5 ppm respecto del metil- β -glucopiranosido donde se observa a 61,9 ppm y constituye una prueba de la ubicación del grupo sulfato en C-6'. El espectro FAB de iones negativos de **{9}** muestra el anión cuasimolecular a m/z 693 [M - H]⁻. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C (**tabla 5**) del Pycnopodiósido C concuerdan con los de literatura y confirman la ubicación del azúcar en C-24⁹⁷ (ver parte experimental).

El Luridósido A {7} (**fig. 33**) presenta un ión molecular cationizado de m/z 709 $[M + Na]^+$ en su espectro de iones positivos (FAB⁺). Si se incorporan a la matriz sales de potasio se observa el ión a m/z 725 $[M + K]^+$.

La comparación de los datos espectroscópicos de RMN ¹H y de ¹³C (**tabla 5**) del Luridósido A con el Pycnopodiósido A⁹⁷ (**fig. 33**) como compuesto de referencia permite establecer que el Luridósido A contiene como aglicona 5 α -colest-3 β ,6 α ,8,15 β ,24-pentol.



**Fig. 32 - Luridósido A {7} R = SO₃Na,
Compuesto {10} R = H**

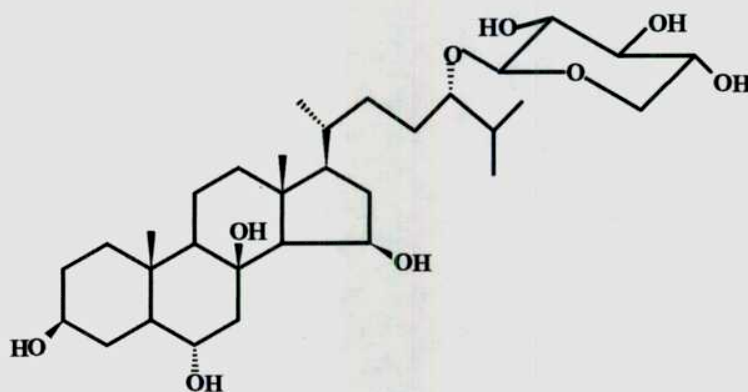


Fig. 33 - Pycnopodiósido A

El desplazamiento del valor de δ de los metilos angulares cuando el espectro protónico del Luridósido A es medido en piridina- d_5 respecto al correspondiente en metanol (CD_3OD) (δ 1,56, H_3 -19 y δ 1,35, H_3 -18 frente a 1,27 y 1,00 en metanol, respectivamente) indica una interacción 1-3 diaxial entre los metilos angulares y el hidroxilo de C-8.

La comparación de los valores de RMN ^{13}C (tabla 5) de la porción del azúcar de {7} con los del Amurensósido C (fig. 36) sugieren además la presencia de 4'-sulfato- β -D-xilopiranososa unida al C-24 del esteroide. Por hidrólisis ácida del Luridósido A, preparación del aldononitrilo acetilado del monosacárido obtenido y su análisis por cromatografía gaseosa (CGL) se confirmó la presencia de xilosa. La presencia del grupo sulfato se confirma por solvólisis en una mezcla dioxano - piridina para dar el producto desulfatado {10} (fig. 32) idéntico al Pycnopodiósido A⁹⁷. El desplazamiento de la señal correspondiente al H-4' del Luridósido A desde δ 4,19 ppm a δ 3,50 ppm en el producto desulfatado establece la posición del sulfato en C-4'. En el espectro RMN ^{13}C el C-4' del Luridósido A se desplaza +6,2 ppm (77,7 a 71,5 en el producto desulfatado) mientras que C-3' y C-5' sufren desplazamientos de -2,0 ppm y -2,1 ppm, respectivamente, relativos al Pycnopodiósido A⁹⁷.

La configuración D de la xilosa se establece por comparación del valor experimental del desplazamiento químico de carbono 13 para el C-1 con los calculados para D- y L-xilosa unida a 2(S)-pentanol. Se utilizó el método de Shashkov y colaboradores¹⁰³ que permite determinar un parámetro desconocido de un azúcar tal como la configuración absoluta o la configuración del carbono anomérico a partir de parámetros estereoquímicos. Los valores calculados para el desplazamiento químico de C-1 son:

β -D- xilosa 105,0 ppm

β -L-xilosa 102,0 ppm

resultando el valor experimental de 104,7 ppm en concordancia con la configuración D, al igual que en el caso de otros xilósidos aislados de estrellas.

Se sugiere la configuración S del C-24 dado que todas las señales de la cadena lateral resultan idénticas con las de los carbonos correspondientes del Pycnopodiósido A y el Amurensósido A. Por otro lado, se supone que la introducción del azúcar en C-24 provocaría diferencias significativas en el espectro de los epímeros 24S y 24R¹⁰⁴. Riccio y colaboradores⁹² desulfataron el Amurensósido A, metilaron (ICH₃ en DMF), hidrolizaron (HCl 2M en MeOH) y prepararon los ésteres de Mosher¹⁰⁵ del alcohol en C-24 (**fig. 34**). Comparando los valores de carbono 13 de la cadena lateral con los correspondientes a los ésteres de compuestos modelo sintéticos, (24R) y (24S)-5 α -colestano-6 β -metoxi-3 α ,5-ciclo-24-ol, pudieron establecer la configuración 24S en el Amurensósido A. La perfecta superposición de los datos de RMN ¹³C del Luridósido A con el Amurensósido A permitió establecer la configuración S del C-24 del Luridósido.

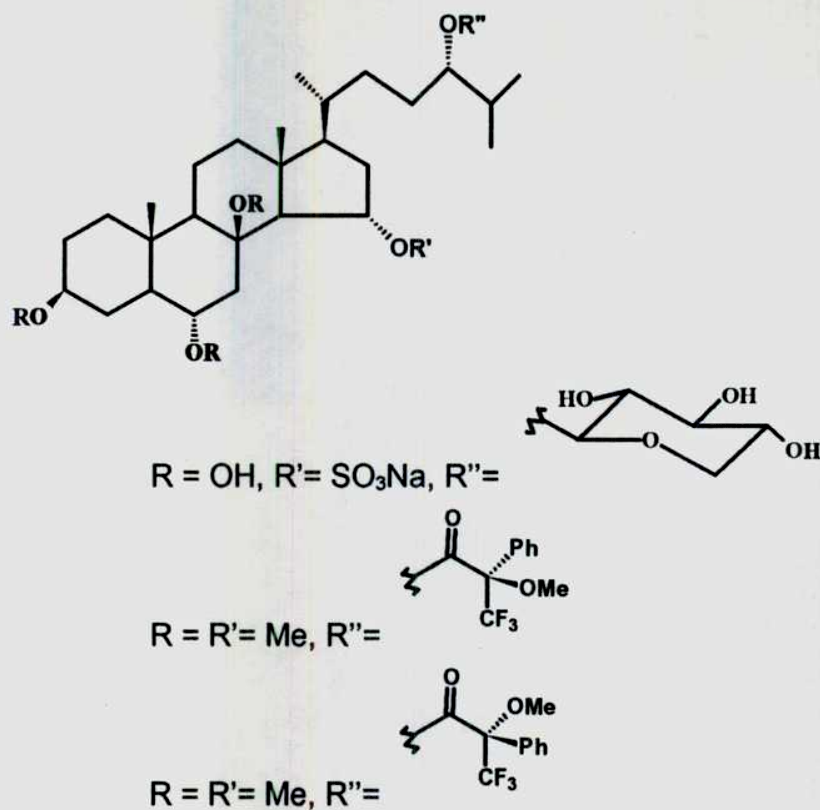


Fig. 34 - Amurensósido A y los ésteres de Mosher de la correspondiente aglicona esteroidal

El Luridósido A es isómero del Pycnopodiósido B⁹⁷. Se diferencian únicamente en la ubicación del grupo sulfato, en C-4' de la xilosa en el Luridósido A y en C-3 de la aglicona en el Pycnopodiósido B.

Tabla 5 - RMN ^{13}C de los Luridósidos A {7}, B {8} y compuestos relacionados

Carbono	Pycnopodiósido A	Amurensósido A	Luridósido A{7}	Luridósido B{8}	Amurensósido C
C-1	39,5	38,6	39,4	39,4	38,8
C-2	31,5	31,9	31,4	31,5	32,0
C-3	72,2	72,0	72,2	72,2	72,0
C-4	32,4	33,0	32,3	32,4	33,1
C-5	54,0	52,7	53,8	53,8	52,9
C-6	67,7	70,2	67,7	67,7	70,3
C-7	50,0	41,4	C	C	41,3
C-8	77,5	35,1	77,5	77,5	35,4
C-9	57,6	55,3	57,4	57,4	55,5
C-10	38,0	37,2	38,0	38,0	37,4
C-11	19,8	22,1	19,7	19,8	22,2
C-12	43,5	42,0	43,4	43,3	42,0
C-13	44,5	43,8	44,3	44,2	44,8
C-14	62,8	61,5	62,6	62,6	63,9
C-15	71,2	81,7	71,1	71,0	74,0
C-16	42,4	38,7	42,5	43,6	42,9
C-17	58,1	55,1	57,9	57,6	54,9
C-18	16,5	13,7	16,5	16,7	13,9
C-19	14,0	13,9	14,1	14,1	13,9
C-20	36,3	36,6	36,4	41,0	40,9
C-21	19,0	19,0	18,9	21,0	21,3
C-22	32,8	32,7	32,6	141,2	140,8
C-23	29,1	29,0	28,7	128,3	128,4

C-24	86,5	86,3	86,3	89,5	89,0
C-25	32,0	32,0	32,0	33,9	33,9
C-26	18,3	18,2	18,5	18,5	18,4
C-27	18,3	18,5	18,3	19,3	19,2
C-1'	104,9	105,0	104,7	104,3	104,2
C-2'	75,4	75,4	75,3	75,4	75,4
C-3'	78,0	77,9	76,0	76,1	76,2
C-4'	71,5	71,4	77,7	77,5	77,6
C-5'	66,7	66,7	64,6	64,9	64,9

c - debajo de la señal del CD₃OD.

El Luridósido B {8} es el análogo Δ^{22} del Luridósido A. Presenta en su espectro de masa FAB de iones positivos el ión molecular cationizado a m/z 707 [M + Na]⁺ y 723 [M + K]⁺, dos unidades de masa menor que el Luridósido A.

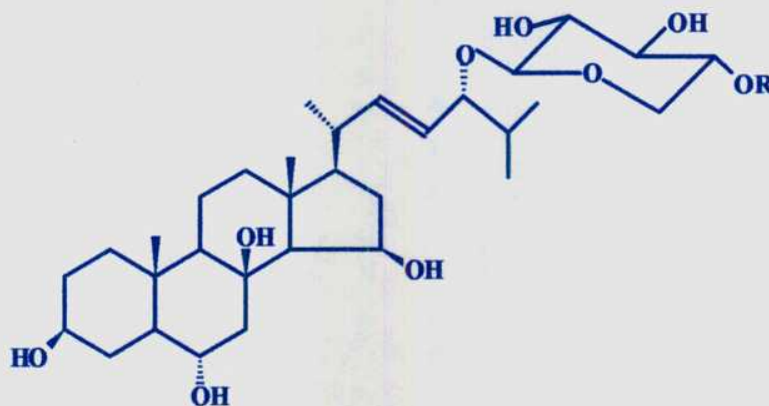


Fig. 35 - Luridósido B {8} R = SO₃Na

Compuesto {11} R = H

En su espectro de RMN ¹H presenta un multiplete a δ 5,35 correspondiente a los hidrógenos olefínicos. Por comparación de los datos de RMN ¹³C del

Luridósido B con el Luridósido A (**tabla 5**) para el esqueleto esteroidal y con el RMN ^{13}C del Amurensósido C (**fig. 36**) para la cadena lateral ((24S)-24-O-(4'-sulfato- β -D-xilopiranososa)-5 α -colest-(22E)-en-3 β ,6 α ,15 α ,24-tetrol)¹⁰⁶ (**tabla 5**) se confirma la presencia de 5 α -colest-(22E)-en-3 β ,6 α ,8,15 β ,24S-pentol como aglicona, glicosidada con 4'-sulfato-xilopiranososa en C-24.

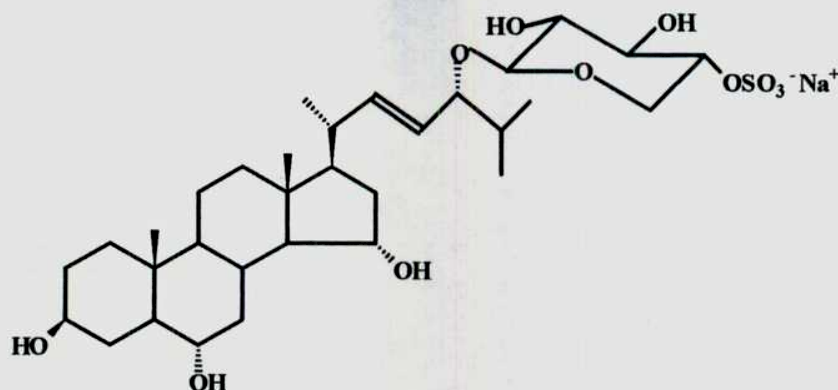
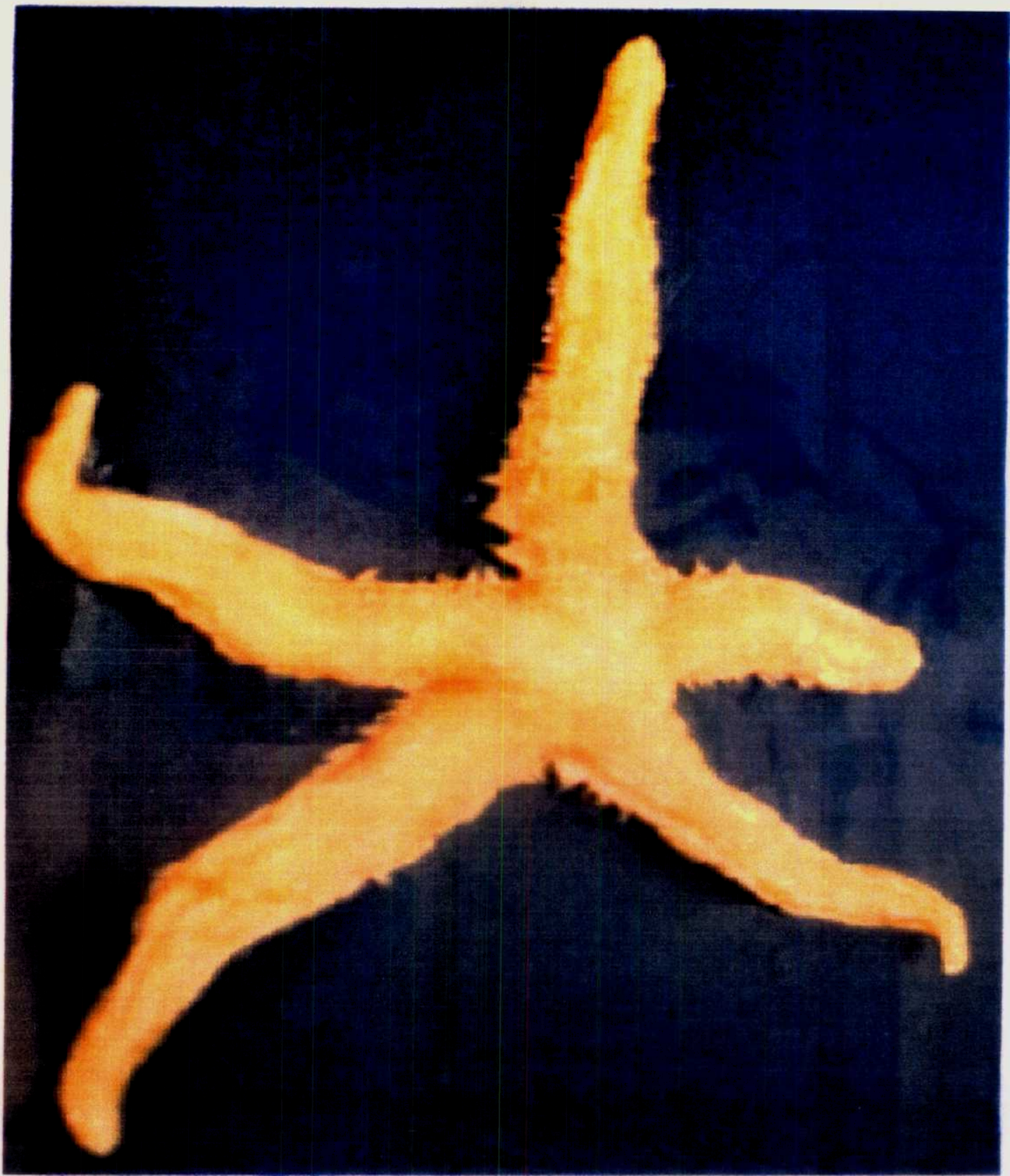


Fig. 36 - Amurensósido C

La hidrólisis ácida del Luridósido B (ver reacciones generales) y el análisis por CG del aldononitrilo peracetilado del monosacárido confirman la presencia de xilosa. Por solvólisis en dioxano-piridina de **{8}** se obtiene el producto desulfatado **{11}** (**fig. 35**) en el que se observa igual desplazamiento de la señal de H-4' que para el Luridósido A, confirmando la ubicación del grupo sulfato en C-4'.



Luidia ludwigi scotti (Bell, 1917)
(1:1)

1-4 COMPUESTOS AISLADOS DEL ASTEROIDEO ***Luidia ludwigi* scotti Bell (1917)**

El segundo organismo estudiado en este trabajo fue el asteroideo *Luidia ludwigi* scotti Bell (1917). La estrella (5,2 kg) fue recolectada en agosto de 1993 en Bajo Oliveira, en las cercanías de San Antonio Oeste, provincia de Río Negro. Fue identificada por el Dr. Alejandro Tablado del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" donde se conserva una muestra "voucher" (MACN N° 31.241).

Los organismos fueron inmediatamente congelados a -20 °C tras su recolección y conservados en frío. El procedimiento de purificación fue similar al utilizado con *Cosmasterias lurida*. Tras la homogeneización y extracción con EtOH (6 litros), se evaporó el solvente a presión reducida y el extracto acuoso se percoló por una columna de Amberlite XAD-2 (1 kg) eluyendo primero con agua y luego con MeOH. Por evaporación del MeOH se obtuvo el material crudo (7,9 g), el cual fue cromatografiado en Sephadex LH60 (80 cm x 4 cm d. i. ; 100g) utilizando MeOH-H₂O (2:1) como eluyente. Se juntaron fracciones de 10 ml. Las fracciones 33-44 contenían la mezcla cruda de "asterosaponinas", mientras que las fracciones 45-55 la mezcla de esteroides polihidroxilados. Cada fracción se purificó por cromatografía en columna seca de fase reversa (Davisil C-18 (35-75 μ)) eluyendo con MeOH-H₂O (65:35). Se colectaron fracciones de 50 ml que se analizaron por ccd. La purificación final se logró por CLAR utilizando una columna Bondclone C-18 y MeOH-H₂O (60:40) como eluyente. Las asterosaponinas puras así obtenidas fueron caracterizadas como los Acanthaglicósidos B {12} (10,5 mg) y C¹⁰⁷ {13} (24,0 mg) (fig. 37) aislados previamente a este trabajo de *Acanthaster planci*¹⁰⁷. El Acanthaglicósido C fue también aislado de *Astropecten latespinosus*⁹³

como un derivado desulfatado obtenido por desulfatación de la mezcla cruda de glicósidos y luego de *Asterina pectinífera*^{108,42} y *Patiria miniata*⁴³.

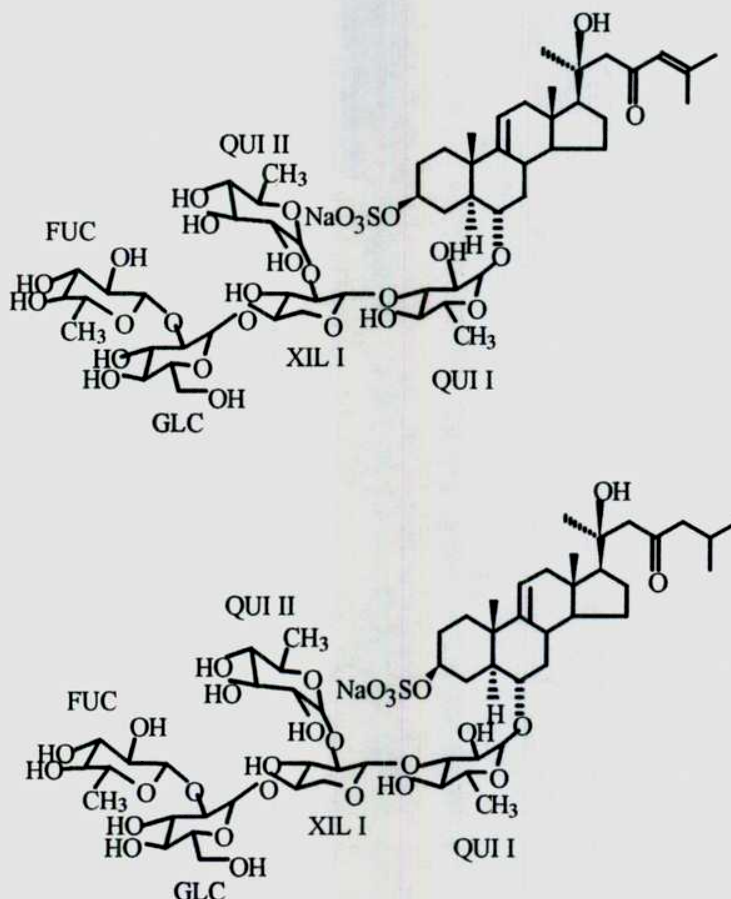


Fig. 37 - Acanthaglicósidos B {12} y C {13}.

El Acanthaglicósido B presenta en su espectro FAB de iones positivos los iones moleculares cationizados a m/z 1287 $[M + Na]^+$ y 1303 $[M + K]^+$.

En el espectro de RMN 1H del Acanthaglicósido B se observan un singlete olefínico a δ 6.2 (1H, s, H-24) y los protones de los metilos sobre doble enlace a δ 1.90 (3H, sa, H₃-26) y δ 2.11 (3H, sa, H₃-27), además de las señales a δ 4,21 (1H, m, H-3 α) y 5,37 (1H, da, $J = 5,5$ Hz, H-11) características de las agliconas esteroidales de asterosaponinas.

En el espectro FAB de iones positivos del Acanthaglicósido C se observan los iones moleculares cationizados a m/z 1305 $[M + K]^+$ y 1289 $[M + Na]^+$.

En el espectro RMN 1H del Acanthaglicósido C se observan las señales de una aglicona 20-hidroxi-23-ona (Thornasterol A).

Los Acanthaglicósidos B y C poseen la misma secuencia de azúcares. Esta se establece por comparación de los valores de RMN ^{13}C de la cadena de oligosacárido de los Acanthaglicósidos B y C (**tabla 6**) con los correspondientes del Thornasterósido A, el cual contiene la misma secuencia excepto la galactosa unida al C-4' de la xilosa I, que en los Acanthaglicósidos es reemplazada por glucosa. La secuencia se confirmó además por comparación de los espectros RMN ^{13}C con los informados en literatura¹⁰⁷.

Tabla 6 - RMN ^{13}C (Piridina- d_5) de la porción glicosídica de los Acanthaglicósidos B {12}, C {13} y el Thornasterósido A

	Carbono	{12}	{13}	Thornasterósido A
Qui I	1	104,7	104,7	105,1
	2	74,1	74,1	74,2
	3	89,7	89,6	90,2
	4	74,3	74,3	74,6
	5	71,9	71,8	72,0
	6	18,0	18,0	18,2
Xil	1	104,4	104,4	104,4
	2	82,8	82,8	82,6
	3	75,5	75,5	75,7
	4	77,6	77,6	79,2

Qui II	5	64,3	64,2	64,7
	1	105,4	105,3	105,1
	2	75,5	75,5	75,7
	3	76,8	76,8	76,9
	4	76,2	76,1	76,3
	5	73,7	73,7	73,8
Gx [*]	6	18,5	18,4	18,7
	1	101,7	101,6	102,4
	2	84,6	84,5	83,5
	3	77,6	77,6	75,1
	4	71,0	70,9	69,5
	5	78,6	78,5	76,9
Fuc	6	62,0	62,0	62,2
	1	106,9	106,8	107,2
	2	71,9	71,8	72,0
	3	74,8	74,7	75,1
	4	72,4	72,4	72,7
	5	71,9	71,8	72,0
	6	17,2	17,1	17,5

* Glc en {12} y {13}, Gal en Thornasterósido A

De los 3 esteroides polihidroxilados aislados de *Luidia ludwigi*, dos de ellos, 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β ,26-hexaol {14}¹⁰⁹ (18,9 mg) y 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 15-sulfato {15}⁶² (47,0 mg) fueron previamente aislados de las estrellas *Myxoderma platyacanthum* y *Luidia maculata*, respectivamente, y 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 26-sulfato {16} (9,7 mg) resultó novedoso.

En el espectro FAB de iones negativos del compuesto **{14}** se observa el ión cuasimolecular a m/z 467 $[M]^-$ correspondiente a una fórmula $C_{27}H_{48}O_6$.

En el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **{14}** (tabla 7, fig. 38) se observan los carbonos de un esteroide saturado y con seis carbonos oxigenados (uno primario, cuatro secundarios y uno terciario).

Tabla 7. RMN ^{13}C (CD $_3$ OD) de los esteroides {14}, {15} y {16}

Carbono	{16}	{15}	{14}	Carbono	{16}	{15}	{14}
C1	31,7	31,7	31,7	C15	74,3	81,8	85,0
C2	33,6	33,6	33,5	C16	41,5	38,8	83,2
C3	68,3	68,4	68,4	C17	55,0	55,3	60,1
C4	41,8	41,6	41,6	C18	13,8	13,8	15,2
C5	76,4	76,6	76,7	C19	17,4	17,2	17,2
C6	76,6	76,6	76,6	C20	36,6	34,8	31,0
C7	35,3	34,9	35,4	C21	19,1	19,1	18,6
C8	31,3	31,3	31,2	C22	37,4	37,4	37,5
C9	46,6	46,6	46,7	C23	24,5	24,6	24,8
C10	39,3	39,4	39,5	C24	34,9	34,8	35,0
C11	22,1	22,1	22,0	C25	34,4	36,9	37,0
C12	41,8	41,6	42,1	C26	73,8	68,5	68,6
C13	45,1	44,1	44,9	C27	17,3	17,3	17,3
C14	63,6	61,2	61,2				

En el espectro RMN 1H se observan dos dobles dobletes a δ 3,76 ($J = 10,5$ y 3 Hz) y 4,00 ($J = 7,5$ y 3 Hz) correspondientes a los hidrógenos 15β y 16α .

respectivamente y la parte A del sistema ABX a δ 3,45 ($J_{AB} = 11$ Hz; $J_{AX} = 5,5$ Hz) perteneciente a uno de los hidrógenos del grupo metileno de C-26. La parte B aparece debajo de la señal del solvente. Estas señales concuerdan con las publicadas para 5 α -colesta-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-pentol aislado de *Hacelia attenuata*⁸⁸. Se observan además sólo dos dobletes de metilos a δ 0,94 y δ 0,98 ppm que confirman la presencia de una cadena lateral de 26-hidroxicolestano.

Por otra parte, un complejo multiplete centrado a 4,04 ppm, claramente assignable a una función 3 β -hidroxilo, y un singulete ancho a δ 3,50 ppm, característico de un protón ecuatorial, permiten establecer la presencia de una estructura 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxi común en esteroides polihidroxilados de asteroideos.

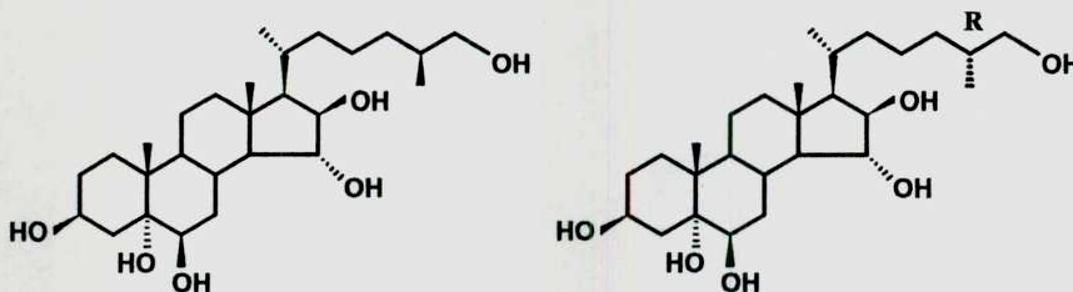


Fig. 38 - Compuesto {14} y su isómero 25R¹⁴⁸

Hasta aquí, sólo restaba establecer la estereoquímica de C-25 del compuesto {14}.

El isómero 25R del compuesto {14} fue aislado de la estrella *Tremaster novaecaledoniae*¹⁴⁸. La inspección del espectro RMN ¹H de los isómeros (fig. 39) revela muy pequeñas diferencias en los desplazamientos de las señales de los protones de C-26 y C-27. (para el isómero 25R δ 3,44 (1H, dd, $J = 10,4; 5,5$ Hz, H₂-26) y 3,35 dd (superpuesto con el solvente) y δ 0,93 (3H, d, $J = 7$ Hz, H₃-27);

para el isómero 25S δ 3,45 (1H, dd, $J = 11; 5,5$ Hz, H₂-26) y 3,34 (1H, dd, H₂-26, debajo de la señal del metanol), y δ 0,94 (3H, d, $J = 7$ Hz, H₃-27).

Los dos compuestos tampoco se diferencian apreciablemente en RMN ^{13}C . (tabla 8). Las diferencias de $\Delta\delta$ son tan pequeñas que se aprecian mejor en el espectro de la mezcla.

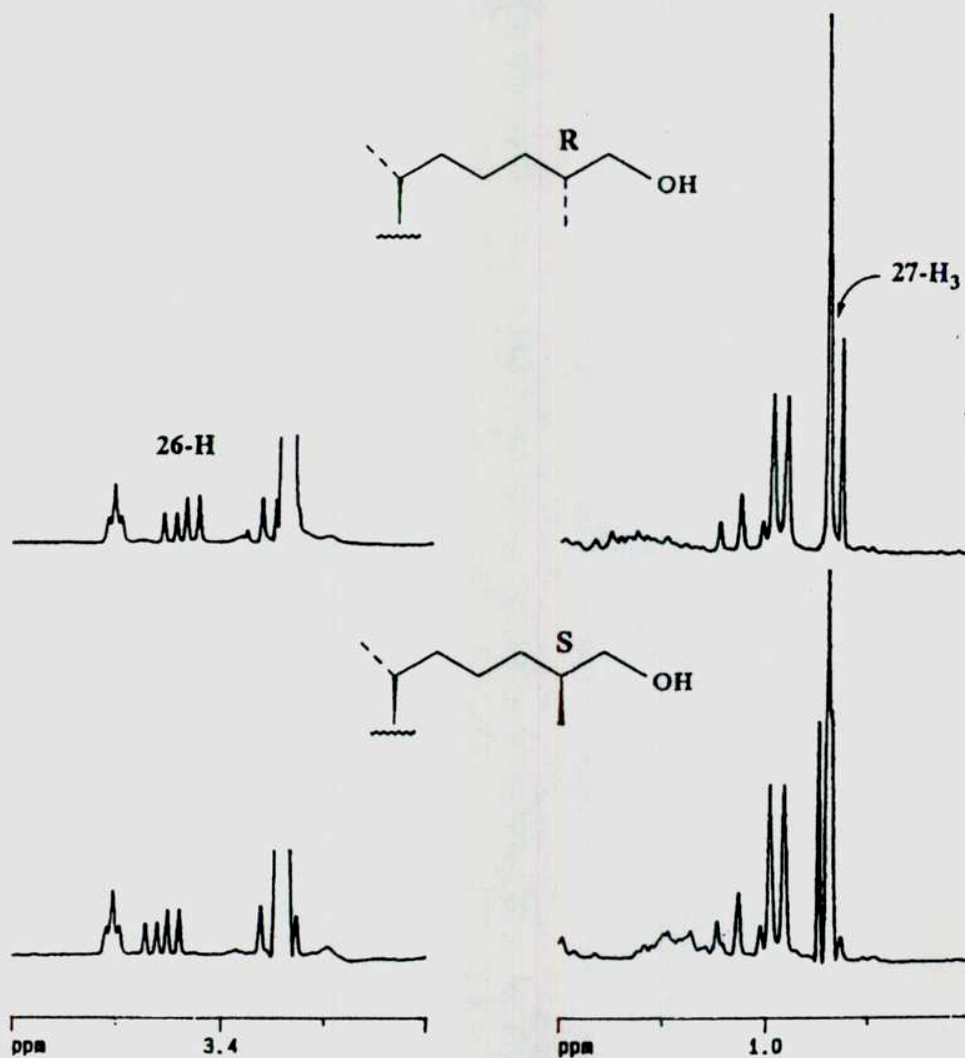


Fig. 39 - RMN ^1H de los isómeros 25R y 25S del compuesto {14}

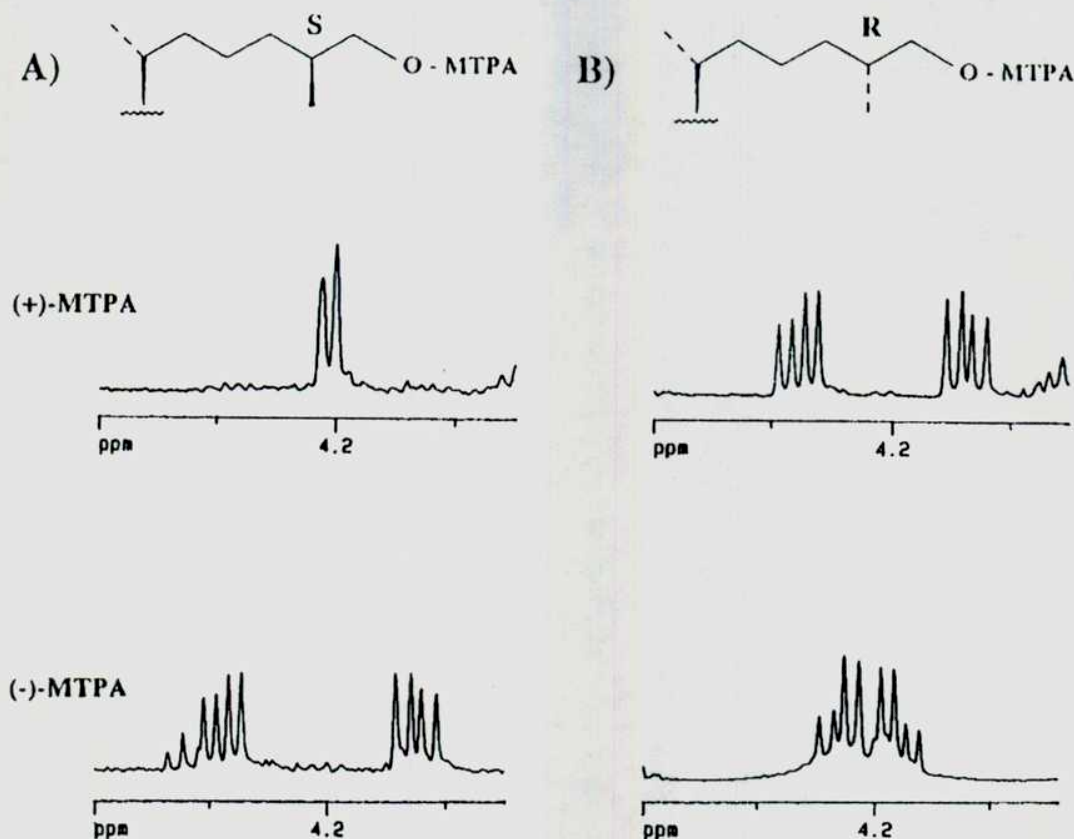


Fig. 40 - RMN ^1H de los ésteres MTPA del compuesto **{14}
(isómeros **25S** y **25R**)**

Con el objetivo de determinar la estereoquímica del C-25 se trató **{14}** con el cloruro de los ácidos *(+)*- y *(-)*- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético obteniéndose 3 β ,26-di-*(+)*-MTPA y 3 β ,26-di-*(-)*-MTPA, respectivamente. El espectro RMN ^1H muestra los protones metilénicos de C-26 como un doblete a δ 4,21 (2H,d, $J=6,5$ Hz) en el éster *(+)*-MTPA. Por otra parte, en el éster formado con *(-)*-MTPA se observan los protones del metileno de C-26 como dos dobles

dobletes a δ 4,12 (dd, $J = 10,5; 6,5$ Hz) y δ 4,30 (dd, $J = 10,5; 5,5$ Hz). De esta forma queda establecida la configuración 25S de {14}.

Los compuestos {15} y {16} (fig. 41) presentan en su espectro FAB de iones negativos un ion a m/z 531 correspondiente a un esteroide pentaoxygenado monosulfatado. El análisis de los espectros de RMN ^1H (parte experimental) y RMN ^{13}C (tabla 7) de ambos compuestos muestra claramente la presencia de un esteroide $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihidroxi sustituido.



Fig. 41 - Compuesto {15} $\text{R}_1 = \text{SO}_3^-\text{Na}^+$, $\text{R}_2 = \text{H}$

{16} $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{SO}_3^-\text{Na}^+$

{17} $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$

En el espectro RMN ^1H de {15} se encuentra un doble triplete a δ 4,47 ($J = 3$ y 9 Hz) correspondiente al H-15 β y dos dobles dobles a δ 3,40 ($J = 10$ y 5 Hz) y δ 3,28, junto a la señal del solvente (CHD_2OD), característico de la señal de los protones metilénicos de C-26, muy común en esteroides polihidroxilados de estrellas. La presencia del grupo hidroxilo de C-26 queda corroborada por la señal a δ 68,5 ppm en el espectro de RMN ^{13}C (fig. 41). Esta señal fue asignada a C-26 en base al experimento DEPT (fig. 42) y distinguida así de la de 68,4 ppm correspondiente al C-3.

Con el objeto de establecer la estereoquímica de C-25, se hizo reaccionar {15} con el cloruro de los ácidos (+)- y (-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético

Tabla 8 - RMN ^{13}C de la cadena lateral de {14} 25R y {14} 25S.

Carbono	25R	25S
C-22	37,3	37,5
C-23	24,8	24,8
C-24	34,7	35,0
C-25	36,9	37,0
C-26	68,6	68,6
C-27	17,1	17,3

Los epímeros (25R) y (25S) de esteroides hidroxilados en C-26 pueden diferenciarse en base al espectro de RMN ^1H de sus ésteres con los ácidos (+)-(R)- y (-)-(S)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético (MTPA, reactivo de Mosher)⁶². En el espectro de RMN ^1H del éster con (+)-MTPA, las señales de los protones del metileno C-26 del isómero 25S aparecen más cercanas entre sí que en el isómero 25R. Exactamente lo contrario ocurre con los ésteres con (-)-MTPA^{105,110,111} *

Así, en 26-hidroxiesteroides no sustituidos en C-24 los protones metilénicos de C-26 aparecen como un doblete a δ 4,21 en el éster con (+)-MTPA en el isómero 25S. (lo mismo vale para el éster con (-)-MTPA del isómero 25R). Por otra parte, en el éster formado por el epímero 25R con (+)-MTPA (ó 25S con (-)-MTPA) se observan los protones del metileno C-26 como dos dobles dobletes a δ 4,08 y δ 4,24 (fig. 40)⁶².

* El término (+) ó (-) MTPA se refiere al éster obtenido por reacción con el cloruro de ácido (+)-R- y (-)-S- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético respectivamente.

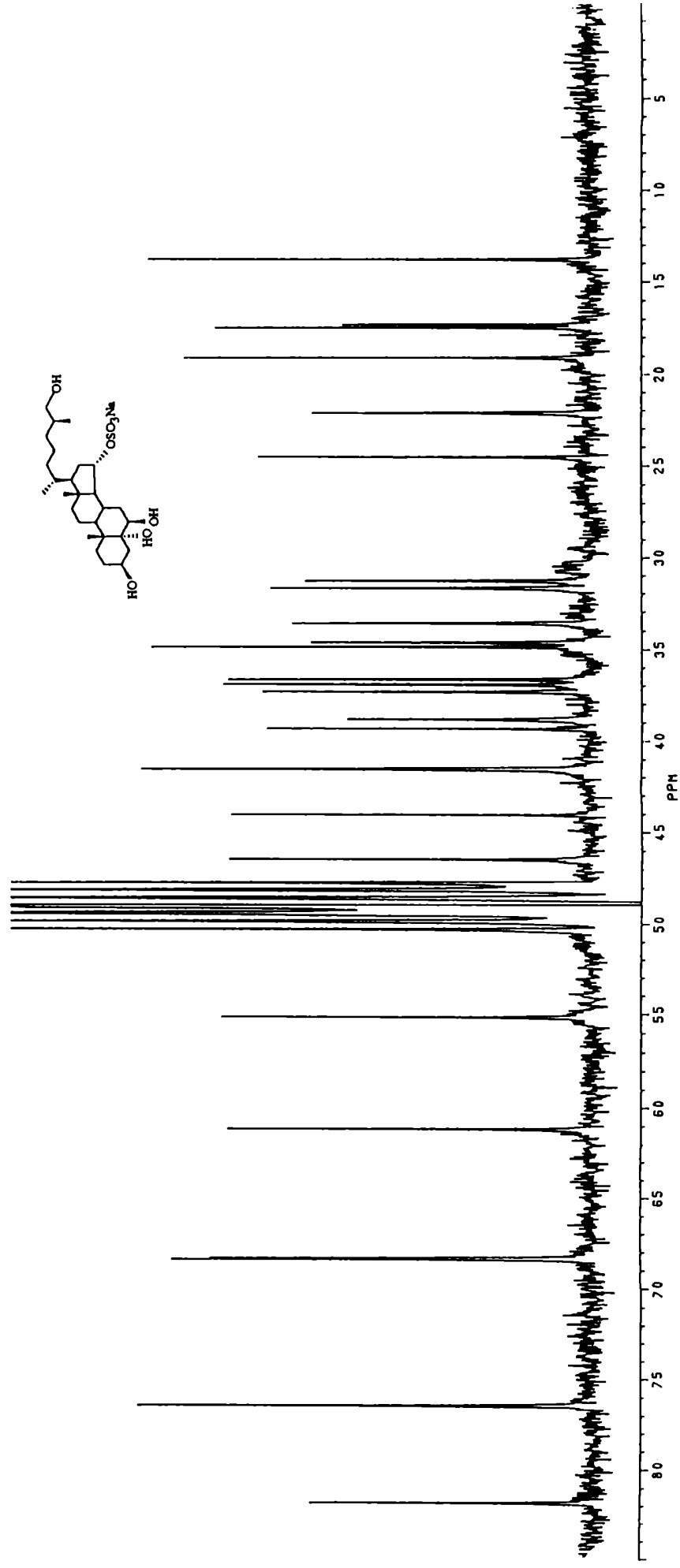


Fig. 42 - RMN ^{13}C del compuesto {15}

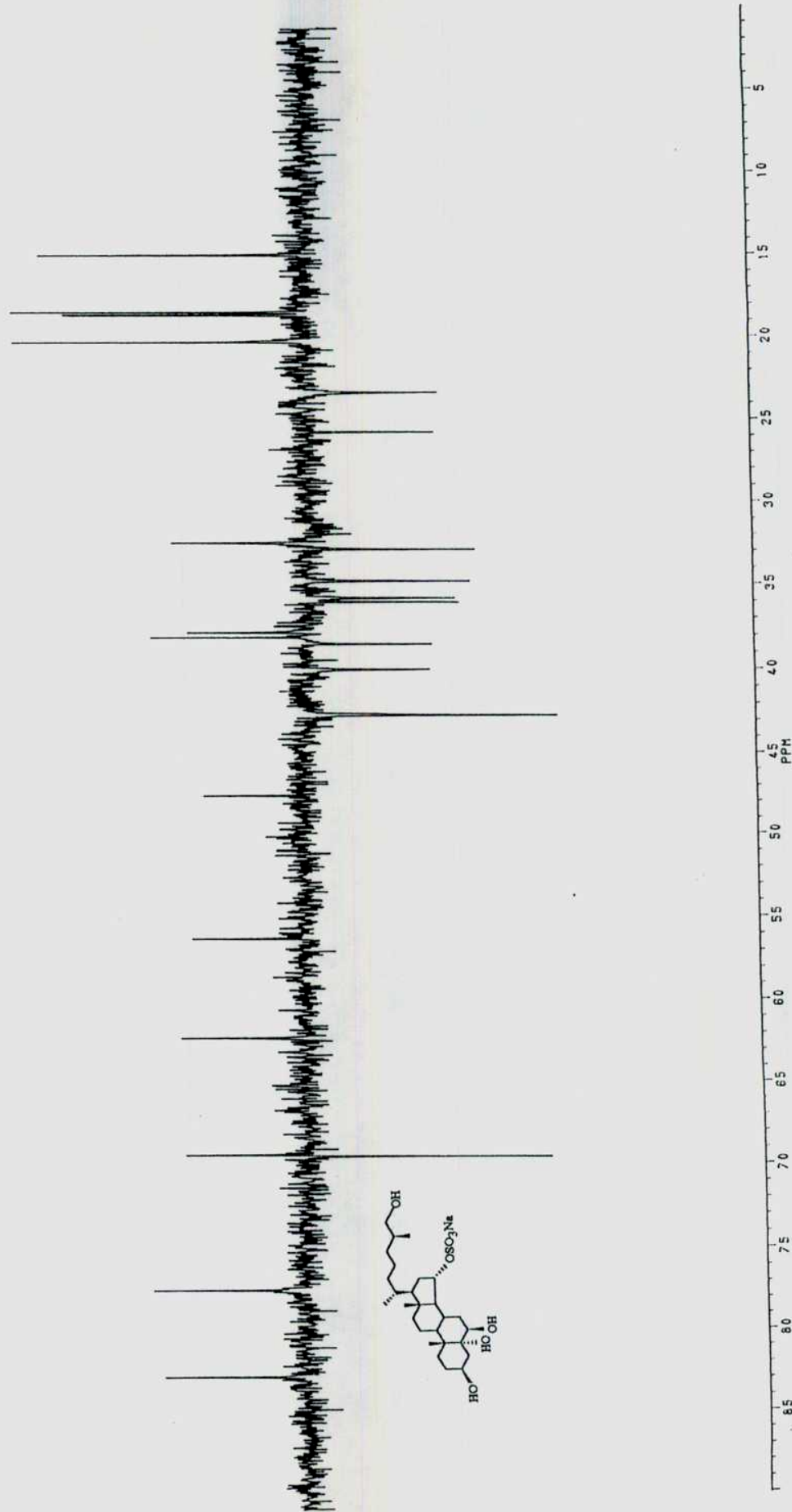
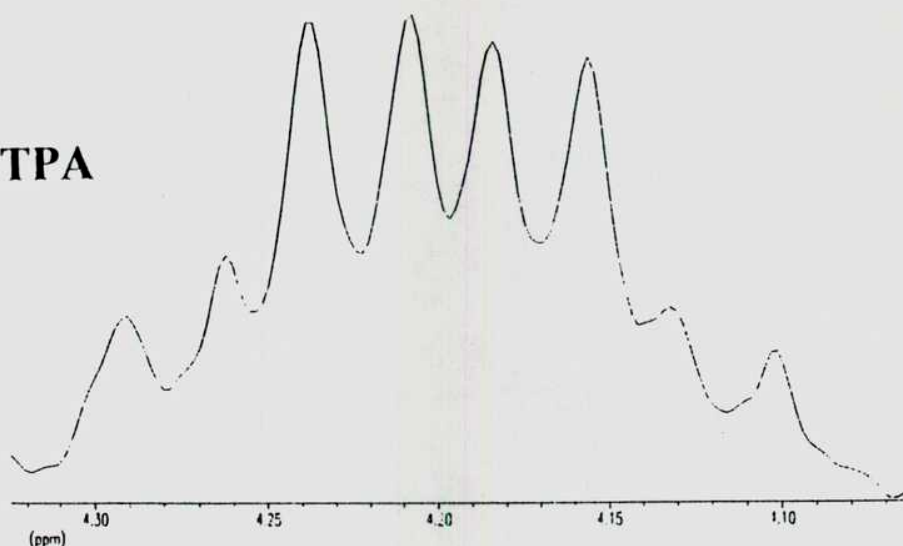


Fig. 43 - Espectro DEPT del compuesto {15}

para dar 3 β ,26-di-(+)-MTPA y 3 β ,26-di-(-)-MTPA. En el espectro RMN ^1H del producto 3 β ,26-di-(+)-MTPA se observaron dos dobles dobletes a δ 4,14 ppm (1H, dd, $J = 10$ Hz y $J = 5,5$ Hz) y δ 4,24 ppm (1H, dd, $J = 10$ Hz y $5,5$ Hz) en tanto que en el caso del éster 3 β ,26-di-(-)-MTPA se observaron también dos dobletes a δ 4,14 ppm (1H, dd, $J = 10$ Hz y $5,5$ Hz) y δ 4,26 ppm (1H, dd, $J = 10$ Hz y $5,5$ Hz), levemente aunque claramente más separados, indicando la configuración 25S del compuesto {15}. (fig. 44).

(+)-MTPA



(-)-MTPA

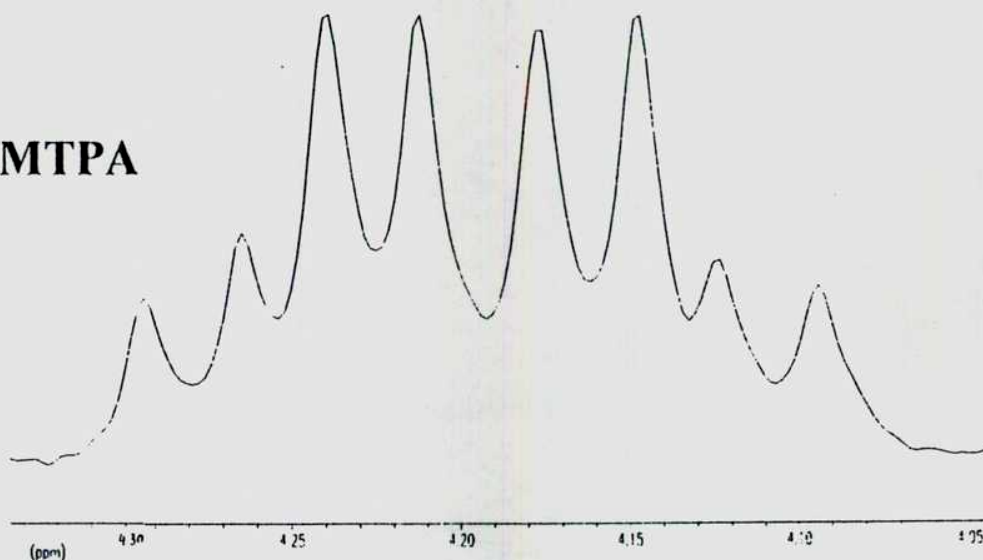


Fig. 44 - RMN ^1H de los ésteres MTPA del compuesto {15}

La desviación de los valores “normales” de los ésteres 3,26-di-MTPA de **{15}** no parece ser consecuencia de la presencia del grupo sulfato voluminoso en el C-15 α dado que por remoción del grupo sulfato de **{15}** por desulfatación solvolítica para dar **{17}**, preparación de los ésteres de Mosher 3 β ,26-di-(+)-MTPA y 3 β ,26-di-(-)-MTPA y posterior análisis de los espectros de RMN ^1H no se observaron cambios significativos en el espectro RMN ^1H . (RMN ^1H del compuesto **{17}** y sus ésteres MTPA en parte experimental). Es posible, sin embargo, que en el compuesto **{17}** el hidroxilo de C-15 α interaccione con el grupo MTPA de C-26 provocando cambios en la conformación de la cadena. Esto no ocurriría en el compuesto **{14}** porque la presencia del grupo hidroxilo 16 β podría provocar la proyección de la cadena lateral lejos del anillo D. De esta forma, el desplazamiento de los protones del metileno C-26 en los ésteres MTPA dependen de los sustituyentes del anillo D, sin embargo la comparación de los desplazamientos de los protones C-26 en los espectros de los ésteres (+) y (-)-MTPA permite asignar la estereoquímica del C-25.

La presencia de una función hidroxilo en C-26 es común en esteroides polihidroxilados aislados de estrellas. Sin embargo un grupo sulfato en esa posición es muy poco usual. Los únicos ejemplos previos a **{16}** son los esteroides polihidroxilados aislados de *Styracaster caroli*¹¹² (**fig. 45**).

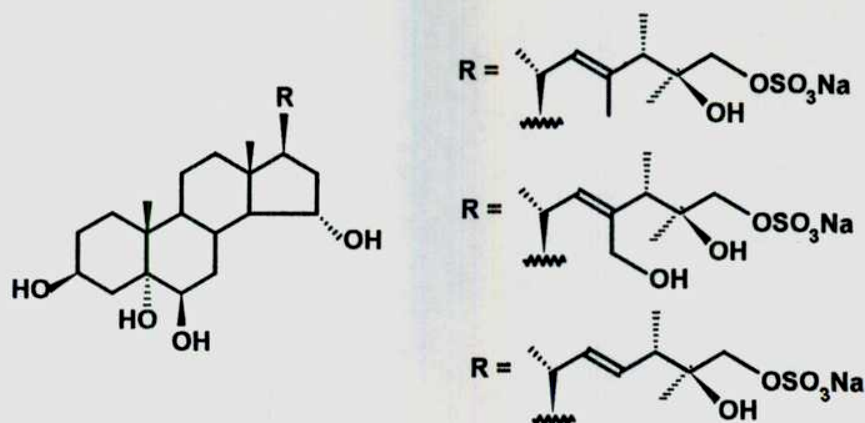


Fig. 45 - Compuestos sulfatados en C-26 aislados de *Styrcaster caroli*

Por otra parte, otros dos compuestos conteniendo la misma cadena lateral que el polihidroxiesteroide {16}, pero como una mezcla de los isómeros 25R y 25S {18} y {19} fueron aislados del ofiuro *Ophiarachna incrassata*¹¹³ (fig. 46).

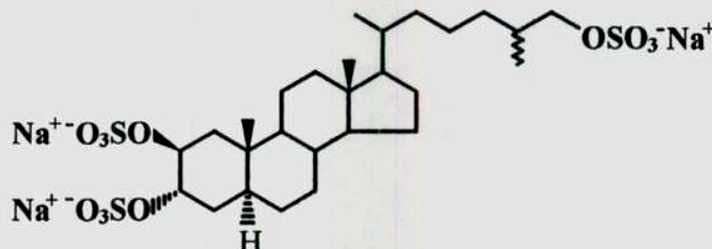


Fig. 46 - Compuesto {18} (25R + 25S)

{19} Δ5 (25R + 25S)

En el espectro de RMN ¹³C totalmente desacoplado de {16} (tabla 6) se observan 27 carbonos. Mediante una secuencia DEPT se establece la presencia de cuatro metilos, diez metilenos, seis metinos, tres carbonos cuaternarios (uno oxigenado), tres -OCHR- y un -OCH₂-. La comparación de los espectros de RMN ¹³C de {16} con los de los compuestos de referencia {15} y 5α-colesta-3β,5,6β,15α,26-pentol {17}⁶² permite establecer la presencia de una estructura

3 β ,5 α ,6 β ,15 α ,26-pentol. Las diferencias de desplazamiento químico de {16} relativas al pentol {17} observadas para el C-25 (-2,5 ppm) y C-26 (+5,4 ppm) permiten establecer la posición del grupo sulfato en C-26. Además, la comparación de los datos de RMN ^{13}C de la cadena lateral con los de los compuestos de referencia {18} y {19} aislados de *Ophiarachna incrassata* confirman la posición C-26 sulfatada¹¹³.

La estructura {16} queda confirmada por análisis del espectro RMN ^1H y su comparación con los de los compuestos {15}, el producto de desulfatación {17} y los esteroides sulfatados en C-26 {18} y {19}.

Cuando el espectro RMN ^1H de {16} es medido en piridina- d_5 se observa un fuerte desplazamiento de la señal del metilo C-19 respecto del espectro en metanol (δ 1,74 vs 1,16 en CD_3OD). Esto es indicativo de una interacción 1,3-diaxial entre el metilo C-19 y el hidroxilo de C-6, confirmando la estereoquímica β de este sustituyente¹¹⁴.

La solvólisis en dioxano/piridina de {16} rinde el producto desulfatado {17}. En este producto el C-26 sufre un desplazamiento respecto al compuesto natural de 73,8 a 68,4 ppm.

La configuración natural 20R (H-20 α) asignada a los compuestos {14}-{17} se basa en el desplazamiento químico del metilo C-21.^{115, 116}

Con el objeto de establecer la estereoquímica de C-25 del compuesto novedoso {16}, se hizo reaccionar su producto de solvólisis {17} con el cloruro de los ácidos (+)- y (-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético obteniéndose 3 β ,26-di-(+)-MTPA y 3 β ,26-di-(-)-MTPA, respectivamente.

El espectro RMN ^1H del éster 3 β ,26-di-(+)-MTPA de {17} muestra las señales del metileno C-26 como dos dobles dobletes a δ 4,15 ppm (1H, dd, J = 10 Hz; 5,5 Hz) y δ 4,24 ppm (1H, dd, J = 10; 5,5 Hz). Para el éster 3 β ,26-di-(-)-MTPA se observan también dos dobletes levemente más separados a (δ 4,13 ppm (1H,

dd, $J = 10$ Hz y $J = 5,5$ Hz)) y δ 4,26 ppm (1H, dd, $J = 10$ Hz y 5,5 Hz). En base a estos resultados se propone la configuración 25S para el compuesto {16} en concordancia con el trabajo de Finamore *et al.*⁶². El producto de solvólisis de {16} resultó ser el mismo compuesto que el obtenido por solvólisis de {15} (compuesto {17}). La desviación de los valores "normales" del ester 3,26-di-(+)-MTPA {17} puede ser consecuencia de la interacción del grupo hidroxilo en C-15 α con el MTPA de C-26.

La caracterización estructural del compuesto {16} permitió identificar a cada epímero en las mezclas de {18} y {19} aisladas del ofiuro *Ophiarachna incrassata*¹¹³. Por comparación de los valores de C-24, C-25, C-26 y C-27 (tabla 9) se asignó la configuración 25R al epímero mayoritario y 25S al minoritario.

Tabla 9. Comparación de los datos de RMN $^{13}\text{C}^a$ de las cadenas laterales de los compuestos {16}, {18} y {19}.

Carbono	{18} ^b	{19} ^b	{16}
20	37,00 (37,10)	37,00 (37,10)	36,60
21	19,20	19,20	19,10
22	37,40 (37,30)	37,40 (37,30)	37,36
23	24,51 (24,45)	24,51 (24,45)	24,33
24	34,77 (34,88)	34,71 (34,88)	34,88
25	34,36 (34,40)	34,36 (34,41)	34,42
26	74,08 (73,96)	74,08 (73,96)	73,85
27	17,04 (17,25)	17,04 (17,25)	17,33

^a Valores relativos al pico central del CD₃OD = 49 ppm.

^b Mezcla de los isómeros 25R- y 25S-. Los valores entre paréntesis corresponden a los desplazamientos del isómero minoritario.

1.5 - ESTEROLES DEL ASTEROIDEO *Luidia ludwigi*

Los esteroides de asteroideos y holoturias se componen en general de una mezcla compleja de compuestos de C_{26} , C_{27} , C_{28} y C_{29} , en la que predominan las estructuras mono (Δ^7) y diinsaturadas^{79, 117}.

El extracto etanólico de la estrella *Luidia ludwigi* Scotti Bell (1917) se purificó por elución a través de una columna de Amberlite XAD-2, y se cromatografió luego por Sephadex LH60 como ya se describió. Las fracciones (10 ml) fueron analizadas por ccd en sílica con n-BuOH-AcOH-H₂O (4:5:1) (fase superior) como solvente de desarrollo y revelando por pulverización con H₂SO₄ y calentamiento en estufa a 105 °C. Las fracciones 33-44 contenían la mezcla cruda de asterosaponinas, las fracciones 45-55 la mezcla de esteroides polihidroxilados mientras que la fracción 56-80 contenía la mezcla de esteroides. La purificación de las dos primeras fracciones ya se describió.

La mezcla de esteroides se fraccionó por CLAR de fase reversa obteniéndose 6 subfracciones. Cada subfracción se analizó por CG-EM y RMN ¹H. Se identificaron esteroides mono y diinsaturados aunque no se aislaron esteroides Δ^5 ni esteroides $\Delta^{5,7}$ (tabla 10).

TABLA 10. Esteroles aislados de *Luidia ludwigi*

N°	esterol	TRR *		% (CG)
		CG	CLAR	
{20}	(22E)-24-Norcolesta-7,22-dien-3 β -ol	0,84	0,72	1,5
{21}	(22E)-24-Metil-27-norcolesta-7,22-dien-3 β -ol	0,93	0,82	7,7
{22}	Colestan-3 β -ol	0,94	1,12	3,9
{23}	(22E)-Colesta-7,22-dien-3 β -ol	0,96	0,82	12,2
{24}	Colest-7-en-3 β -ol	1,00	1,00	29,4
{25}	(22E)-(24S)-24-Metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol	1,05	0,92	19,8
{26}	24-Metilcolest-7-en-3 β -ol	1,09	1,12	8,3
{27}	24-Metilcolesta-7,24(28)-dien-3 β -ol	1,11	0,82	5,7
{28}	24-Etilcolesta-7,22-dien-3 β -ol	1,14	1,12	2,3
{29}	24-Etilcolest-5-en-3 β -ol	1,23	1,20	2,6

* Tiempo de retención relativo (TRR) respecto a colest-7-en-3 β -ol.

Los compuestos {20}, {24}, {25}, y {29} se obtuvieron como compuestos puros en las fracciones 1, 4, 3 y 6 respectivamente. La fracción 2 (TRR CLAR 0,82) contenía los esteroides {21}, {23} y {27} y representaba el 29,6% de la mezcla de esteroides. El espectro RMN ^1H de la fracción 2 presentó señales a δ 4,65 y δ 4,70 ppm correspondientes a los hidrógenos vinílicos de C-28 del esteroide {27}. En el RMN ^1H de la mezcla fue posible asignar además un doblete a δ 0,93 ppm correspondiente al metilo secundario (C-24) del amuresterol ((22E)-24-Metil-27-norcolesta-7,22-dien-3 β -ol)⁷⁸. En la fracción 5 se identificó el esteroide {26} y los compuestos minoritarios {22} y {28}.

Los espectros RMN ^1H de los esteroles aislados muestran las señales de los metilos C-18 y C-19 a δ 0,54 y 0,80 ppm, respectivamente, y son valores típicos de esteroles Δ^7 .

En los compuestos diinsaturados se observó la señal del metilo C-21 como un doblete a δ 1,01 ppm, desplazado 0,1 ppm a campos bajos debido a la presencia del doble enlace *trans* Δ^{22} .

La estereoquímica 24S del Stellersterol **{25}** quedó establecida a partir del espectro RMN ^1H dado que los metilos C-26, C-27 y C-28 aparecen como dobletes a δ 0,838, 0,822 y 0,910 ppm de acuerdo a lo reportado por Goad¹¹⁸.

En el caso de 24-etilcolest-7-en-3 β -ol **{29}** la asignación de la estereoquímica es complicada dado que si bien los grupos etilo e isopropilo no son equivalentes en ambos epímeros, la diferencia de desplazamiento químico es menor que en los epímeros 24-metilo¹¹⁸.

El primer trabajo que informa acerca del contenido de esteroles de una estrella de la costa patagónica argentina fue realizado con *Cosmasterias lurida*⁸⁷ por nuestro mismo grupo de trabajo. El estudio de los esteroles de *Luidia ludwigi* es el segundo informe en ese sentido.

La distribución de esteroles Δ^7 en el *phylum Echinodermata* es una evidencia a favor de la relación filogenética entre asteroideos y holoturias.

Es interesante notar la ausencia de 4-metilesteroles y esteroles $\Delta^{8(9)}$ encontrados en esponjas¹¹⁹.

Los dos esteroles mayoritarios de *Luidia ludwigi* son colest-7-en-3 β -ol y (22E)-(24S)-24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol en coincidencia con *Cosmasterias lurida*. Por otro lado, 24-etilcolest-7-en-3 β -ol, el componente principal de la mezcla de esteroles de pepinos de mar¹¹⁷, está presente en asteroideos aunque en mucha menor proporción (*C. lurida* (5,8%) y *L. ludwigi* (8,3%)).

En ambas estrellas se encontraron importantes cantidades relativas de 24-metilesteroles (**tabla 11**). Es importante notar la abundancia de (22E)-colest-7,22-dien-3 β -ol **{23}** no encontrado en *Cosmasterias lurida* aunque sí como componente minoritario en otros asteroideos como *Asterias amurensis* (1,8 %), *Asterina pectinífera* (5,8 %) ó *Certonardoa semiregularis* (3,2%)⁷⁸.

El 11,6 % de la composición de esteroides en *C. lurida* corresponden a 24-etil- Δ^7 -esteroides mientras que en *L. ludwigi* ese porcentaje es mucho menor (4,9 %). Esteroides 24-etil- Δ^7 están siempre presentes en asteroideos aunque su porcentaje es variable (13,3 % en *A. pectinífera*, 2,5 % en *Distolasterias sticantha*). Todas las especies de asteroideos estudiadas contienen cantidades importantes de esteroides C₂₈ y C₂₉ aunque biosintéticamente se ha probado que estos organismos son incapaces de biosintetizar 24-alquil-esteroides. Por otra parte los esteroides Δ^7 provienen de la biotransformación de esteroides Δ^5 (**fig. 17**), siendo estos últimos, en la mayor parte de los casos, de origen dietario^{120, 121}.

TABLA 11 - Comparación del contenido de esteroides de dos asteroideos del Atlántico Sur.

Compuesto	% <i>Luidia ludwigi</i>	% <i>Cosmasterias lurida</i>
Colest-7-en-3 β -ol	29,4	20,3
(22E)-colest-7,22-dien-3 β -ol	12,2	---
24-metil- Δ^7 -esteroides	41,5	39,5
24-etil- Δ^7 -esteroides	4,9	11,6

2. PHYLUM ECHINODERMATA - CLASE ECHINOIDEA

2.1 - ESTEROLES DEL EQUINOIDEO *Encope emarginata*

Los equinoideos son animales de cuerpo globoso o hemisférico, limitado por un sólido caparazón constituido por placas mineralizadas y yuxtapuestas. Contienen la boca y el ano situados en los extremos del eje vertical que coincide con el eje de simetría pentagonal. En el caparazón hay espinas, pedicelos y esférulas. La simetría es pentagonal, confundida en las llamadas especies irregulares.

El equinoideo *Encope emarginata* (Leske, 1778), muy común en el Atlántico Sur, fue recolectado (4 kg) cerca de la costa de Mar del Plata en 1993 e identificado por el Dr. Alejandro Tablado del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" en donde se conserva una muestra con el N° 31.238. Se separó el aparato masticatorio (0,1 g) del cuerpo de cada ejemplar y cada parte se analizó por separado. Se homogeneizó el material en MeOH, se filtró y el sólido se extrajo con AcOEt. Los extractos orgánicos se juntaron y se llevaron a sequedad. El residuo fue disuelto en MeOH-H₂O (9:1) y se extrajo con n-hexano dos veces. La fase de n-hexano se concentró a presión reducida y el residuo resultante se sometió a una cromatografía en columna de fase reversa Davisil C₁₈ (35-75μ) eluyendo con mezclas de MeOH:H₂O (1:1 - 9:1), MeOH, MeOH:AcOEt (1:1) y AcOEt. Las últimas dos fracciones contienen esteroides. Estas fueron purificadas por cromatografía en columna de sílica gel eluyendo con Cl₂CH₂:hexano (1:1), Cl₂CH₂ y Cl₂CH₂:MeOH (1:1). La mezcla purificada de esteroides fue fraccionada por CLAR obteniéndose los esteroides puros que fueron analizados por CG-EM y RMN ¹H.

En un trabajo previo con este organismo se aisló un pigmento quinónico (**fig. 47**) ampliamente distribuido en equinoideos¹²⁸, pero no se estudió su contenido en esteroides. Los pigmentos quinoideos son comunes en microorganismos y plantas, pero en el reino animal se encuentran sólo en equinodermos. Son característicos de erizos y lirios de mar. La composición de los pigmentos en erizos comprende de 2 a 6 componentes. Su concentración en la mezcla varía con las condiciones ambientales y el estadio de desarrollo del animal. El color también es variable.

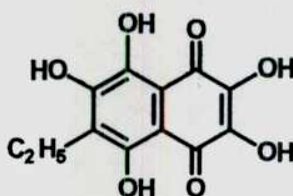


Fig. 47 - Naftoquinona aislada de *Encope emarginata*

Es sabido⁶⁰ que dentro de las cinco clases del *phylum Echinodermata*, en los pepinos de mar (Holoturoideos) y estrellas (Asteroideos) predominan esteroides Δ^7 , mientras que en lirios de mar (Crinoideos), erizos y dólares de arena (Equinoideos) así como en ofiuros (Ofiuroideos) son mayoritarios los esteroides Δ^5 .

Con el objetivo de analizar el contenido de esteroides de *Encope emarginata* y establecer qué contribución a ese contenido tienen la biosíntesis *de novo* y la asimilación o modificación de esteroides dietarios se estudió el contenido de esteroides del aparato masticatorio y del resto del organismo por separado.

Las dos mezclas de esteroides analizadas contienen esteroides Δ^5 con una o dos insaturaciones (**tabla 12**).

Tabla 12 - ESTEROLES DE *Encope emarginata*

Esterol	TRR [*]	%†	%‡
(22E)-24-Norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {30}	0,80	1,5	1,8
24-Metil-27-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {31}	0,91	< 1	< 1
22-Dehidrocolesterol {32}	0,94	6,6	7,1
Colest-5-en-3 β -ol {33}	1,00	70,2	71,4
(22E)-24R-Metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol {34}	1,06	8,1	5,4
24-Metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol {35}	1,14	2,3	2,7
(24R)-24-Metilcolest-5-en-3 β -ol {36}	1,15	8,9	8,7
24-Etilcolest-5-en-3 β -ol {37}	1,30	2,6	3,0

* Tiempo de retención relativo (TRR) respecto de colest-5-en-3 β -ol {33}.

† Composición de esteroides del aparato masticatorio.

‡ Composición de esteroides del resto del organismo.

El colesterol representa en ambos casos más del 70% de la mezcla de esteroides. Los espectros de RMN ¹H de los compuestos con dos insaturaciones, (22E)-24-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {30}, 22-dehidrocolesterol {32} y (22E)-24R-metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol {34} (brasicasterol), presentan las señales de los metilos C-18 y C-19 a δ 0,70 y 1,01 ppm, y un doblete correspondiente al metilo C-21 a δ 1,01, consecuencia del doble enlace Δ^{22} (trans).

La estereoquímica del C-24 en el brasicasterol {34} queda establecida por el espectro RMN ¹H que presenta los dobletes de los metilos C-26, C-27 y C-28 a δ 0,836, 0,819 y 0,911 de acuerdo con lo informado por Rubinstein *et al*¹¹⁸.

Los compuestos 24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol {35} y 22-dehidrocolesterol {32} eluyeron como una mezcla (77% y 22% resp.) en la CLAR de ambas mezclas de esteroides. El espectro de RMN ^1H de la mezcla muestra señales a δ 4,65 y 4,70 ppm correspondientes al metileno C-28 confirmando la presencia de {35}.

Ambas fracciones contienen (24R)-24-metilcolest-5-en-3 β -ol {36} (campesterol) y 24-etilcolest-5-en-3 β -ol {37} con abundancias cercanas a 9 y 3% respectivamente, y baja abundancia (< 1%) de 24-metil-27-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {20}. La configuración 24R(α) del compuesto {36} se confirma por el desplazamiento de las señales de los protones de C-27 y C-28 en su espectro RMN ^1H .

Del aparato masticatorio se aislaron además de los esteroides de la **tabla 11**, 24-etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol (estigmasterol) {38}, colest-3 β -ol {39} y colest-4-en-3-ona {40}.

De esta forma, los esteroides más abundantes aislados de *Encope emarginata* son colesterol, campesterol, brasicasterol y 22-dehidrocolesterol junto a cantidades menores de 24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol {35}, (22E)-24-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {30} y 24-metil-27-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {31}. Todos ellos son esteroides Δ^5 muy comunes ya encontrados en equinoideos, excepto 24-metil-27-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {31}. El epímero 24R de este último (ocelasterol) fue encontrado en el *phylum Echinodermata* en el ofiuro *Ophioderma longicaudum*⁶⁰. Además, grandes cantidades de ocelasterol y de (22E)-24-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {30} fueron aislados del dinoflagelado *Gymnodinium simplex*¹²⁹, resultado que es indicativo del origen dietario de estos noresteroides.

Por otra parte, no se detectó desmosterol (colesta-5,24-dien-3 β -ol) en *Encope emarginata* aunque si fue encontrado en *Echinus acutus*¹³⁰, *Echinus esculentus*¹³¹ y *Temnopleurus toreumatus*¹³².

La abundancia de brasicasterol {34} (8 %) en la mezcla de esteroles del aparato masticatorio respecto de la del resto del equinoideo (5,4 %) constituye un resultado interesante. Brasicasterol es un componente del fitoplancton¹³³ y un precursor en la biosíntesis de occelasterol y (22E)-24-norcolesta-5,22-dien-3 β -ol {30} por dos demetilaciones consecutivas.

Por último, estigmasterol, colestán-3 β -ol y colest-4-en-3-ona se encontraron sólo en el aparato masticatorio. Estigmasterol fue previamente aislado de los equinoideos *Echinus acutus* y *Paracentrotus lividus*¹³⁰. Colestán-3 β -ol y colest-4-en-3-ona se encuentran aquí por primera vez en equinoideos aunque fueron aislados de dinoflagelados¹³⁴. Su presencia en cantidades de trazas está de acuerdo con su posible origen dietario.

3 - PHYLUM ECHINODERMATA - CLASE OPHIUROIDEA

Los ofiuros presenan una forma caracterfstica distinta de la de los asteroideos. Además los vigorosos movimientos de los brazos los distinguen fácilmente de éstos últimos. No obstante, se sabe que los ofiuros fósiles presentaban estructuras próximas a los asteroideos, por lo que los dos grupos están emparentados. Se conocen unas 2000 especies, pertenecientes a 250 géneros, dispuestos en 4 órdenes. Los ofiuros presentan casi siempre cinco brazos, sin embargo, unas pocas especies presentan de manera regular seis o siete brazos. En las especies más pequeñas, el disco y los brazos pueden presentar un diámetro conjunto de sólo unos milímetros, mientras que las grandes pueden tener un diámetro de hasta 50 cm, con un disco de 10 cm. Los ofiuros se encuentran en todos los océanos, desde la zona intermareal hasta las grandes profundidades y con frecuencia en densas poblaciones de hasta millones por hectárea. Los representantes de seis familias se encuentran en profundidades de 3000 m; los géneros *Ophiura*, *Amphiophiura* y *Ophiacantha* llegan por debajo de los 7000 m.

La búsqueda de metabolitos secundarios en asteroideos (estrellas) y en holoturoideos (pepinos de mar) recibió marcada atención en los últimos años. Por el contrario, son muy pocos los trabajos publicados sobre el aislamiento de compuestos esteroidales de ofiuros (la primera publicación sobre el aislamiento de esteroides polihidroxilados sulfatados de ofiuros fue en 1985⁶⁰). Dentro de este tipo de compuestos se encontraron:

a) esteroides polihidroxiados sulfatados.

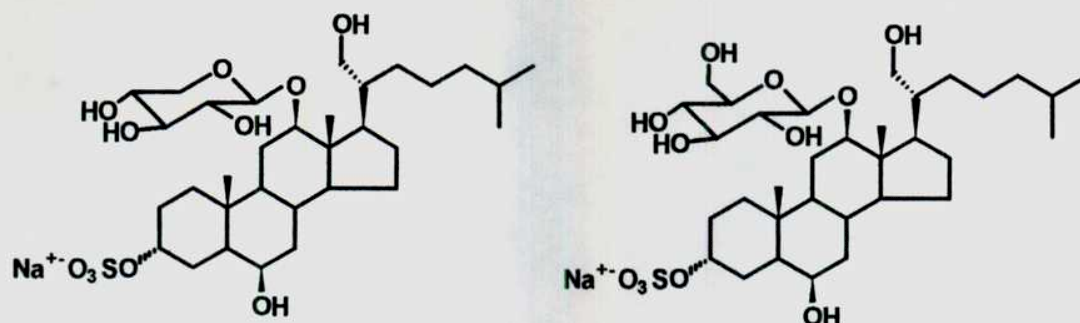
En contraste con la hidroxilación en C-26 y sulfatación en C-3 β común en los compuestos esteroidales aislados de estrellas, los esteroides polares de ofiuros se caracterizan por la hidroxilación y sulfatación en C-3 α y en C-21. En asteroideos, esteroides sulfatados en C-21 sólo fueron encontrados en la estrella *Euretaster insignis*⁴⁶. Otras características distintivas de los esteroides polares de ofiuros son la hidroxilación en C-11 y C-12 y algunas veces en C-2, C-4 y C-5 y la fusión *cis* de los anillos A/B o la presencia de un doble enlace Δ^5 .

Los espectros de RMN ¹³C proveen una buena diferenciación entre las cadenas laterales hidroxiladas en C-26, común en esteroides polihidroxiados de estrellas y los esteroides hidroxilados en C-21 de ofiuros.

Los esteroides sulfatados en C-21 muestran en sus espectros de RMN ¹³C las señales de C-26 y C-27 a δ 23,0 y 23,1 ppm y la señal del grupo -CH₂OH a 63,4 ppm, mientras que en los hidroxilados en C-26 aparecen los metilos a 17,3 ppm (CH₃-27) y 19,2 ppm (CH₃-21) y la señal del hidroximetileno (-CH₂OH) a δ 68,4 ppm.

b) glicósidos de esteroides polihidroxiados

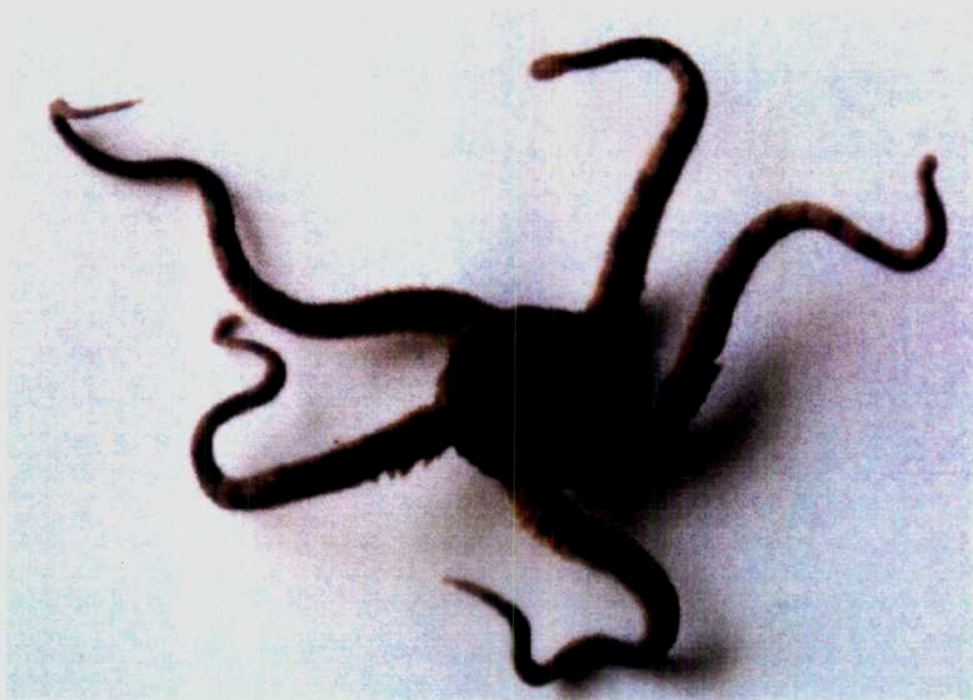
Del ofiuro del Mediterráneo *Ophioderma longicaudum*¹⁶ se aislaron dos glicósidos esteroidales (Longicaudósidos A y B) (**fig. 48**). Ambos tienen una aglicona de tipo 5 α -colest-3 α ,6 β ,12 β ,21-tetrol, un grupo sulfato en C-3 y el monosacárido (β -D-xilosa y β -D-glucosa) en C-12. Estos compuestos son hasta el momento los únicos glicósidos aislados de ofiuros.



**Fig. 48 - Longicaudósidos A y B, glicósidos esteroidales sulfatados
aislados de *Ophioderma longicaudum*¹⁶**

c) esteroides

Existen muy pocos antecedentes respecto al estudio de esteroides de ofiuros. Los esteroides principales de *Ophioderma longicaudum*⁶⁰ o de *Ophiocoma insularia*⁷⁹ son colest-5-en-3 β -ol y (22E, 24S)-24-metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol. No se han aislado de esta clase de organismos monohidroxiesteroides de estructura novedosa.



Ophioplocus januarii (Lütken, 1856)
(1:1)

3.1 - EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS de *Ophioplocus janurarii*

El primer ofiuro estudiado en este trabajo es *Ophioplocus janurarii* (Lütken, 1856). Esta especie es posible encontrarla desde las Antillas hacia el sur, por la costa brasileña hasta la Isla Castillo (Uruguay) y en el Mar Argentino desde la desembocadura del Río de la Plata hasta el Golfo Nuevo. Es una especie tropical y subtropical, muy abundante en el Golfo de San Matías. Se la ha encontrado en profundidades de hasta 180 m. El diámetro del disco puede variar de 4,5 a 22 mm.

El material de este trabajo fue recolectado en 1993 en Bajo Oliveira (1,1 kg), cerca de San Antonio Oeste, en la costa patagónica argentina (41° de latitud sur). Fue identificado por el Dr. Alejandro Tablado del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" donde se conserva un organismo "voucher" identificado como MACN N° 31.239.

Los organismos fueron congelados a -20 °C inmediatamente después de su recolección y extraídos con MeOH. El material sólido del extracto fue separado por centrifugación y el extracto metanólico concentrado a presión reducida. El residuo se particionó entre n-hexano y agua, y la fase acuosa se extrajo con n-BuOH. El extracto butanólico se concentró en evaporador rotatorio y se purificó por una columna de Sephadex LH20 (80 cm x 4 cm d. i.) utilizando metanol como solvente de elución. Se colectaron fracciones de 10 ml y se analizaron por ccd de sílica gel (n-BuOH:AcOH:H₂O (4:5:1), fase superior) y de fase reversa (MeOH:H₂O (65:35)). En ambos casos se reveló por pulverización de la placa con H₂SO₄ y posterior calentamiento en estufa a 105°C. La purificación final se realizó por cromatografía líquida (CLAR) con una columna Bondclone C₁₈ utilizando

MeOH:H₂O (50:50) como solvente de desarrollo. Se obtuvieron cuatro compuestos puros 5 β -Colesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol 3,21-disulfato {41} 8,2 mg, 5 β -colesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol-24(28)-ene 3,21-disulfato {42} 6,4 mg, 5 β -colesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol-(22*E*)-22-eno 3,21-disulfato {43} 6,3 mg y 5 β -24-norcolesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol-(22*E*)-22-eno 3,21-disulfato {44} 3,5 mg.

El compuesto {44} resultó novedoso. Los esteroides {41}, {42} y {43} fueron aislados previamente de los ofiuros *Ophiocoma dentata*, *Ophiarthrum elegans* y *Ophiarachna incrassata*¹³⁵.

Los cuatro esteroides polares aislados de *Ophioplocus januarii* presentan grupos sulfato en C-3 α y C-21, los anillos A/B fusionados en *cis*, y grupos hidroxilos en los carbonos C-4 α y C-11 β .

El espectro FAB de iones negativos del compuesto {41} (fig. 49) muestra el ión cuasimolecular a *m/z* 631 (pequeño) y 617 (pico base) correspondientes a las sales de potasio [(M(SO₃K)(SO₃⁻)] y de sodio [(M(SO₃Na)(SO₃⁻)] del dianión. Se observan además fragmentos intensos de *m/z* 513 y 497 correspondientes a las pérdidas de NaSO₃ (+H) y NaHSO₄ a partir de 617. En el espectro FAB de iones positivos aparecen señales a *m/z* 663 [M + Na⁺] y *m/z* 679 [M + K⁺].

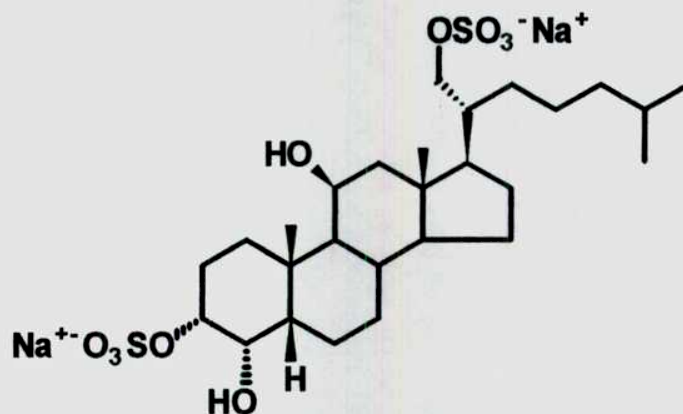


Fig. 49 - Compuesto {41}

En el espectro RMN ^{13}C de {41} se observan 27 carbonos de los cuales cuatro son metilos, diez metilenos, siete metinos, dos carbonos cuaternarios, tres -OCH- y un -OCH₂-. El espectro RMN ^1H confirma la existencia de cuatro grupos metilo, dos unidos a C cuaternarios (δ 0,91, s, H₃-18 y δ 1,13, s, H₃-19), y dos correspondientes al grupo isopropilo (0,87 H₃-26 y 27). Muestra además una señal a δ 3,99 (1H, dd, J = 10; 6,3 Hz) típica del grupo -OCH₂- de C-21. El otro hidrógeno del metileno C-21 aparece a δ 4,21 (dd, J = 10; 3,5 Hz), parcialmente superpuesto con un multiplete que integra para tres hidrógenos. Los valores de δ y J de los protones del metileno C-21 son comparables con los observados en otros esteroides sulfatados en C-21^{60, 46}. La presencia en RMN ^{13}C de las señales de los metilos C-26 y C-27 a δ 23,0 y 23,1 ppm confirma la cadena lateral propuesta¹³⁶. El espectro RMN ^1H de {41} muestra además las señales de H-3 β , H-4 β e H-11 α como un multiplete a δ 4,19. La orientación axial (β) del hidroxilo de C-11 se justifica por el desplazamiento a campos bajos de los metilos angulares ($\delta_{\text{Me-18}}$ 0,91; $\delta_{\text{C-18}}$ 15,1; $\delta_{\text{Me-19}}$ 1,18; $\delta_{\text{C-19}}$ 27,4) dada la interacción 1,3-diaxial de ambos metilos con el hidroxilo 11 β . El desplazamiento químico del metilo C-19 a δ_{C} 27,4 está de acuerdo con la fusión *cis* de los anillos A/B. El compuesto 5 β -colest-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetraol 3,21-disulfato {41} fue aislado previamente de *Ophiocoma dentata*, *Ophiarthrum elegans* y *Ophiarachna incrassata*¹³⁵.

El producto de solvólisis de {41} muestra en su RMN ^1H los protones del grupo hidroximetileno a δ 3,69 (dd, J = 11; 4,5 Hz) y δ 3,74 (dd, J = 11; 3 Hz) y los hidroximetinos a δ 4,22 (c, J = 2,5 Hz, H-11), 3,90 (t, J = 4 Hz, H-4) y 3,62 (dt, J = 12 Hz; 3,5 Hz, H-3). Por irradiación a δ 3,62 (H-3) se transforma la señal de H-4 en un doblete (J = 4 Hz) y por irradiación a δ 3,90 (H-4) se transforma el doble triplete a δ 3,62 en un doble doblete (J = 12; 4 Hz). Uno de los hidroxilos se encuentra α a un carbono con un sólo hidrógeno mientras el otro es vecino de un

carbono metilénico, lo cual está de acuerdo con su ubicación en C-4 y C-3, respectivamente, como única posibilidad en un esqueleto esteroideal.

La orientación ecuatorial del hidroxilo de C-3 se define sobre la base del acoplamiento axial-axial ($J = 12$ Hz) del hidrógeno de C-3 con el hidrógeno axial del C-2. El valor de J (4 Hz) de la señal de H-4 está de acuerdo con su orientación ecuatorial.

La posibilidad de una estructura 5α -colest-3 β ,4 β ,11 β -trihidroxi se descarta mediante el cálculo del desplazamiento del metilo C-19 a δ_H 1,33 ppm usando los parámetros de incremento por sustituyente de Arnolds¹³⁷ y δ_C 17,9 ppm sobre la base de los efectos de sustituyentes para esteroides polihidroxilados¹². Ambos valores están alejados de los experimentales (δ_H 1,16 y δ_C 27,4 ppm).

El compuesto {42} (fig. 50) muestra en su espectro FAB de iones negativos la especie correspondiente al ión cuasimolecular a m/z 629, doce unidades de masa mayor que el compuesto mayoritario {41} (m/z 617). Se observan además iones a m/z 525 ($629 - NaSO_3 + H$) y m/z 509 ($629 - NaHSO_4$). La comparación de los datos de RMN ^{13}C con los de {41} (parte experimental) sugiere para el compuesto {42} una cadena lateral que incluye un carbono exometilénico. El espectro RMN 1H contiene las señales olefínicas como singuletes anchos a δ 4,72 y 4,74 y las señales de CH_3 -26 y CH_3 -27 a δ 1,06 (6H, d, $J = 7$ Hz). Por otra parte en RMN ^{13}C se observan dos carbonos olefínicos a δ 106,9 ppm (CH_2) y δ 157,9 ppm (C). El compuesto {42} es idéntico al aislado previamente como componente minoritario de *Ophiocoma dentata*¹³⁵.

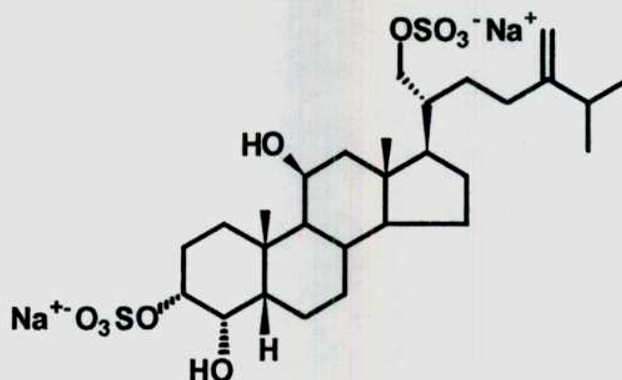


Fig. 50 - Compuesto {42}

El espectro FAB de iones negativos del compuesto {43} (fig. 51) presenta un ión cuasimolecular de m/z 615, dos unidades de masa menor que el de {41}. Otros fragmentos importantes son 511 ($615 - \text{SO}_3\text{Na} - \text{H}$) y 495 ($615 - \text{NaHSO}_4$). El espectro RMN ^1H muestra los hidrógenos olefínicos a δ 5,25 (1H, dd, $J = 8; 15$ Hz, H-22) y a δ 5,41 (1H, m, H-23). Además, la presencia del doble enlace Δ^{22} provoca el desplazamiento del metilo C-18 a δ 0,94 y un pequeño desplazamiento de uno de los hidrógenos del metileno C-21 a δ 3,80 (δ 3,99 en {41}). Los carbonos olefínicos aparecen en el espectro RMN ^{13}C de {43} a δ 131,0 ppm (C-22) y δ 134,0 ppm (C-23). Este compuesto se diferencia del compuesto mayoritario {41} únicamente en el doble enlace $\Delta^{22\text{E}}$ de la cadena lateral y también fue encontrado con anterioridad a este trabajo en *Ophiocoma dentata*¹³⁵.

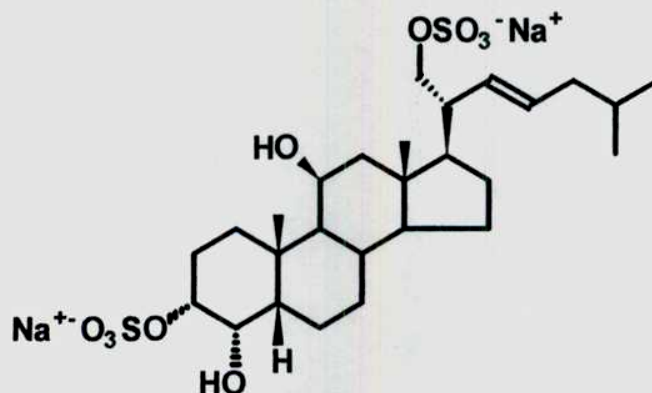


Fig. 51 - Compuesto {43}

El compuesto novedoso **{44}** (fig. 52) presenta en su espectro RMN ^{13}C 26 señales. Mediante un experimento DEPT se revela la presencia de cuatro metilos, siete metilenos, siete metinos, dos carbonos cuaternarios, tres grupos -OCHR-, un grupo -OCH₂- y un doble enlace disustituido. El espectro FAB de iones negativos de **{44}** muestra el ion cuasimolecular a m/z 601 [$\text{M}(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_3^-)$] y picos intensos a m/z 497 y 479 correspondientes a los fragmentos obtenidos por las pérdidas de NaSO_3 con transferencia de protón [$601 - \text{NaSO}_3 - \text{H}$] y NaHSO_4 [$601 - \text{NaHSO}_4$].

El espectro RMN ^1H de **{44}** contiene dos singuletes a δ 0,93 y 1,15 ppm asignados a los metilos C-18 y C-19, respectivamente, y dos dobletes superpuestos a δ 0,96 (6H, d, $J = 6,6$ Hz) correspondientes a los metilos de un grupo isopropilo. Las señales a δ 3,90 (1H, dd, $J = 9,2; 6,2$ Hz, H-21) y δ 4,17 (4H, m) son típicas de una sustitución $4\alpha, 11\beta$ -dihidroxi $3\alpha, 21$ -disulfato del esteroide. Los valores de δ de los metilos C-18 y C-19 reflejan la presencia del grupo hidroxilo 11β , dada la interacción 1,3-diaxial con los dos metilos angulares¹³⁵. El desplazamiento a campos bajos del metilo C-19 en el espectro RMN ^{13}C (δ_c 27,4 ppm) indica una fusión *cis* de los anillos A/B. El espectro de RMN ^1H muestra además, dos señales olefínicas a δ 5,25 (1H, dd, $J = 15,1; 7,8$ Hz, H-22) y δ 5,43 (1H, dd, $J = 15,1; 6,2$ Hz, H-23) indicando un doble enlace *trans*. En el espectro COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **{44}** los protones olefínicos correlacionan entre sí y el de δ 5,43 se acopla a su vez con H-25 (δ 2,21). Este último correlaciona con los metilos del grupo isopropilo a δ 0,96 (d, $J = 6,6$ Hz). El desplazamiento en RMN ^{13}C de los carbonos 20 y 21 a δ 46,6 y 71,5 ppm, respectivamente, también observado en el compuesto **{43}**, confirma la presencia del doble enlace Δ^{22} .

El compuesto **{44}** presenta la misma unidad tetracíclica que los otros compuestos aislados de este organismo pero la cadena lateral tiene un carbono menos. La comparación de los datos espectroscópicos de **{44}** con los de

compuestos relacionados^{138, 139} que presentan la misma cadena lateral permite establecer una estructura (22E)-5 β -24-norcolest-22-eno-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetraol 3,21-disulfato.

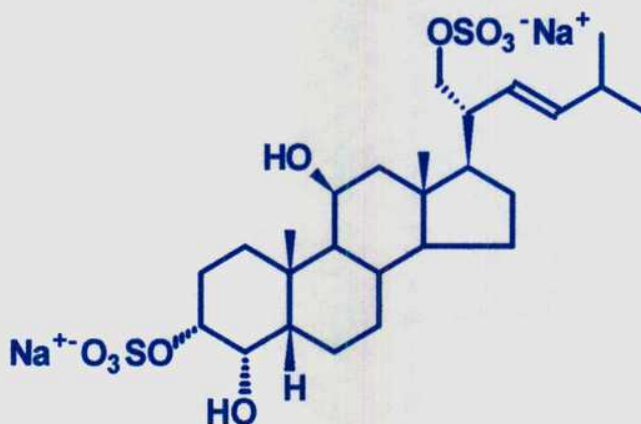


Fig. 52 - Compuesto {44}

La configuración 20R (configuración natural) de los esteroides de *Ophioplocus januarii* se asignó por analogía con otros esteroides 20R aislados de ofiuros. Esta configuración se asigna por comparación de los RMN ¹H con los de los (20R) y (20S)-colest-5-en-3 β ,21-diol sintéticos. En el RMN ¹H del isómero (20R) se observa un singulete a δ 3,70 (CH₂OH), mientras que en el isómero (20S) aparece un multiplete centrado a δ 3,62¹⁴⁰.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ESTEROIDES SULFATADOS **DE OFIUROS**

Los esteroides polihidroxilados sulfatados muestran importantes actividades biológicas tales como actividad antiviral³⁸ o inhibición de quinasas de tirosina (PTK). La inhibición de estas enzimas, de importancia en el control del cáncer¹⁴¹, estimuló la búsqueda de antagonistas de PTK como posibles agentes

anticancerígenos¹⁴². Sin embargo, un muy pequeño número de productos marinos muestra inhibición de PTK¹⁴³⁻¹⁴⁷.

Anderson y col.³⁸ investigaron la actividad antiviral de cuatro compuestos aislados de ofiuros contra el virus del herpes observándose moderada actividad en los compuestos {45} y {45'} y carencia de actividad a las concentraciones de trabajo (1 y 10 µg/ml) para los otros dos compuestos. (El compuesto {47} fue aislado también en este trabajo)

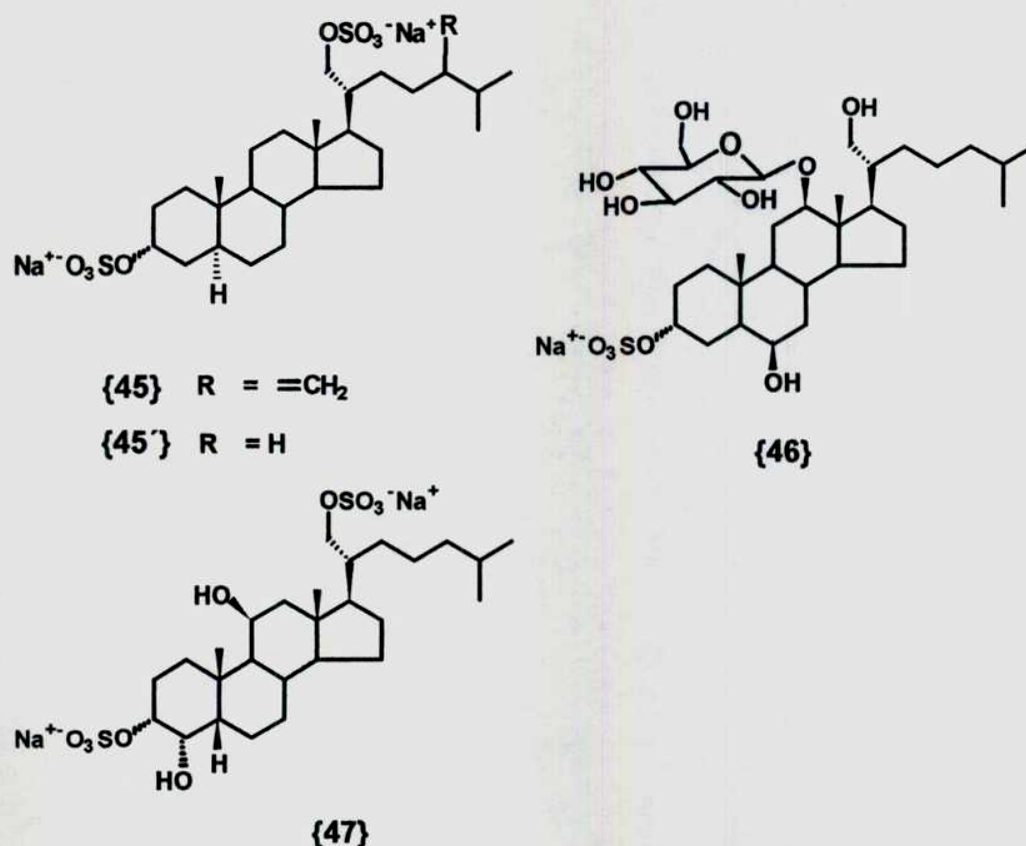


Fig. 53 - Compuestos ensayados respecto de su actividad antiviral por Anderson y col³⁸.

En un trabajo muy reciente, McKee y col.¹⁴⁷ estudiaron la actividad anti HIV-1 y HIV-2 de 22 esteroides sulfatados aislados de esponjas, asteroideos y ofiuros (fig. 54).

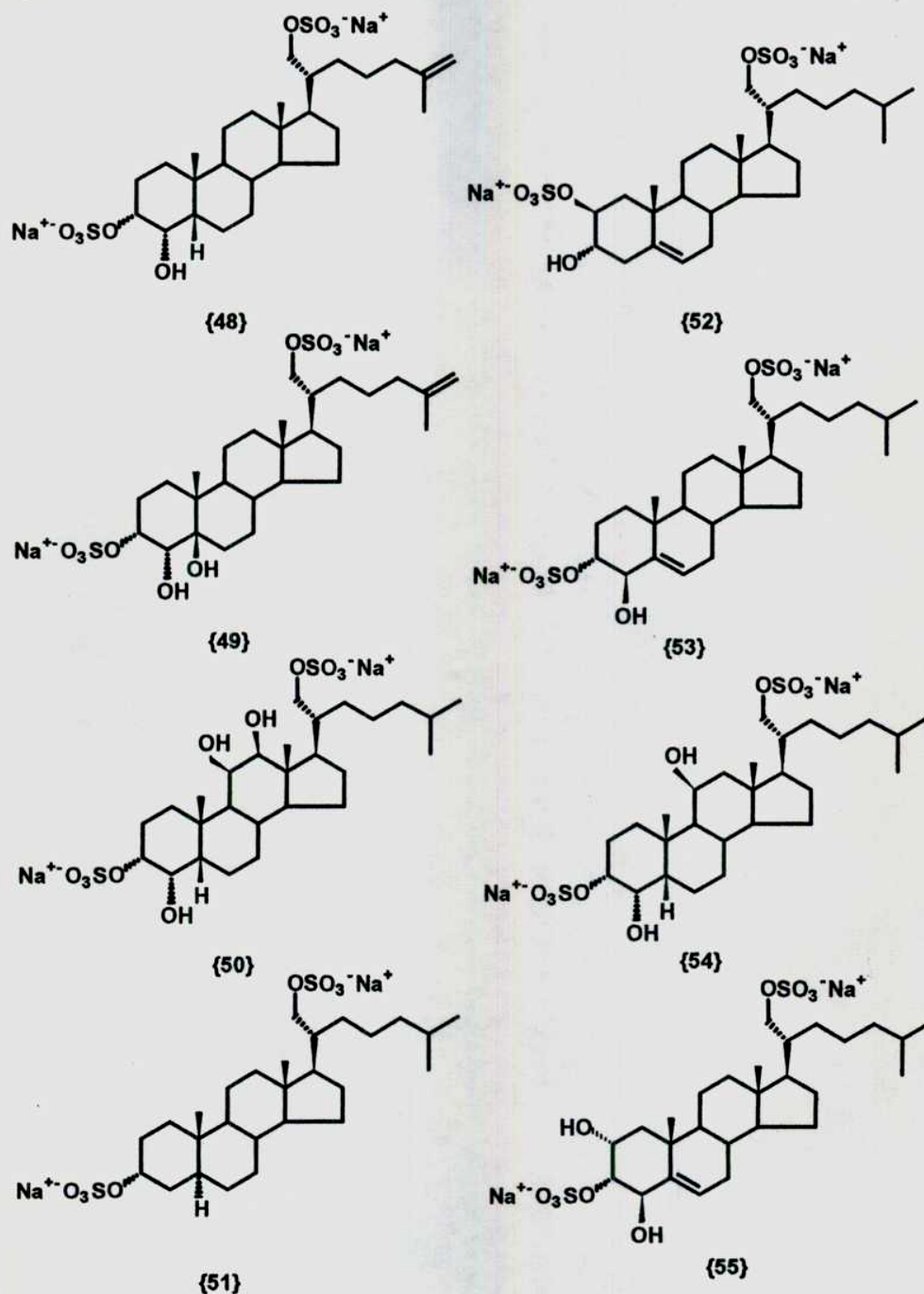


Fig. 54 - Compuestos aislados de ofiuros testeados respecto de su actividad anti HIV-1 y HIV-2 por Mackie et al¹⁴⁷

Los esteroides de ofiuros estudiados por McKee *et al*¹⁴⁷ inhiben el efecto citopático de la infección por HIV-1 en células CEM-SS con valores de EC₅₀ entre 86 y 241 μM (a excepción de {55} que no muestra actividad). La concentración de esteroide requerida para inhibir la replicación viral es, sin embargo, mayor (cercana al doble) que la necesaria para producir un nivel de citoprotección comparable.

La actividad de los esteroides de estrellas y ofiuros estudiados no se modifica sustancialmente por incorporación de un doble enlace $\Delta^{9,11}$ o por la presencia de posiciones oxigenadas en la cadena lateral. La actividad desaparece por oxigenación del anillo D. De los esteroides disulfatados estudiados {48}, {49} y {52} resultaron los más efectivos en la inhibición del efecto citopático. Sin embargo no fue estudiado el efecto producido por modificaciones en la cadena lateral. En general, aquellos esteroides activos contra HIV-1 resultaron activos también contra HIV-2.

De los compuestos de ofiuros probados por McKee *et al.*, el compuesto {50} fue aislado en este trabajo de tesis del ofiuro *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816), y los esteroides {52} y {55} de *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875). El esteroide {54} fue aislado en este trabajo del ofiuro *Ophioplocus januarii* (Lütken, 1856) y también de *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816).

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE
Ophioplocus januarii

En este trabajo se estudió la actividad antiviral de los compuestos aislados de *Ophioplocus januarii* contra cuatro virus patógenos en humanos: virus del Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus Junín (JV), virus sincitial respiratorio (RSV) y virus del polio (PV).

Los ensayos de actividad antiviral fueron realizados por los Dres. Carlos A. Pujol y Elsa B. Damonte del Laboratorio de Virología, Dpto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El virus HSV-1 provoca infecciones de las mucosas (gingivostomatitis y herpes labial), lesiones dermatológicas, queratoconjuntivitis, y encefalitis. JV causa una grave enfermedad en humanos conocida en nuestro país como fiebre hemorrágica. RSV está asociado a la bronquitis, neumonía y bronquiolitis y PV causa parálisis como consecuencia de un daño neuronal.

Las cepas de virus utilizadas son las siguientes: HSV-1 (cepa F), JV (cepa IV 4454), PV tipo 3 (cepa Sabin) y RSV (cepa Long). El ensayo se realizó sobre monocapas de células Vero y Hep-2 crecidas en microplacas de 24 pocillos en medio de cultivo MEM conteniendo 5% de suero bovino. El medio de mantenimiento (MM) consiste de MEM con 1,5% de suero bovino. Los stocks de HSV-1, JV y PV se prepararon con células Vero mientras que RSV se propagó en células de cultivo Hep-2.

Soluciones de los compuestos

Se prepararon soluciones stock de los compuestos aislados de *Ophioplocus januarii* de concentración 2 mg/ml en metanol y se esterilizaron. Las soluciones fueron conservadas a -20°C hasta el momento del ensayo.

Citotoxicidad sobre células Vero

Se determinó la actividad citotóxica incubando monocapas de células Vero con 40 ó 5 µg/ml de los compuestos en MM. Se incubó durante 7 días a 37°C y se determinó la citotoxicidad por conteo de células viables utilizando azul tripán (tiñe células muertas). Las concentraciones utilizadas están por debajo de la concentración citotóxica 50 (CC50) definida como la dosis del compuesto requerida para reducir el número de células viables en un 50%.

Acción antiviral

Se evaluó la actividad antiviral por dos métodos: mediante la reducción de unidades formadoras de placas (UFP) y por la inhibición del efecto citopático (EC). En el test de reducción de placas, monocapas de células Vero son infectadas con cerca de 50 UFP tanto en presencia como en ausencia de los compuestos. Se realiza la absorción durante 1 hora a 37°C. Se retira el inóculo residual y se incuba con MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa más la dosis correspondiente de cada compuesto. Se contaron las placas luego de un día de incubación a 37 °C para PV, dos días para HSV-1 y 7 días para JV. La actividad antiviral se calcula como el porcentaje de reducción en la formación de placas. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Para evaluar el efecto

citopático monocapas de células Hep-2 fueron infectadas por cuadruplicado con RSV en ausencia y en presencia de los compuestos. Se incubaron células control en cada experimento. Luego de 48 horas de incubación a 37 °C, se examina el efecto citopático en un microscopio invertido. Se establece una escala progresiva: 0 = células normales a 4 = destrucción completa de la monocapa de células. (0 = 100% de inhibición, 1 = 75% de inhibición, 2 = 50% de inhibición, 3 = 25 % de inhibición, 4 = 0 % de inhibición).

Como se indica en la **tabla 13**, los compuestos {42} y {44} muestran actividad inhibitoria contra RSV y actividad contra PV a concentraciones de 40 µg/ml. El compuesto {43} es menos activo contra RSV aunque muestra mayor potencia inhibitoria frente a PV. Todos los compuestos muestran una actividad similar frente a HSV-1 y JV , excepto el compuesto {43} cuyo porcentaje de inhibición de la replicación de JV es de 54%. Los virus HSV-1 y JV son menos sensibles frente a este serie de esteroides sulfatados.

Todos los compuestos ensayados inhiben la replicación viral en forma dependiente de la concentración, mostrando un efecto específico de los compuestos en el desarrollo del virus. No se ha observado actividad antiviral a concentraciones de 5 µg/ml. Por otra parte, la integridad celular fue del 100% aún con concentraciones de 40 µg/ml.

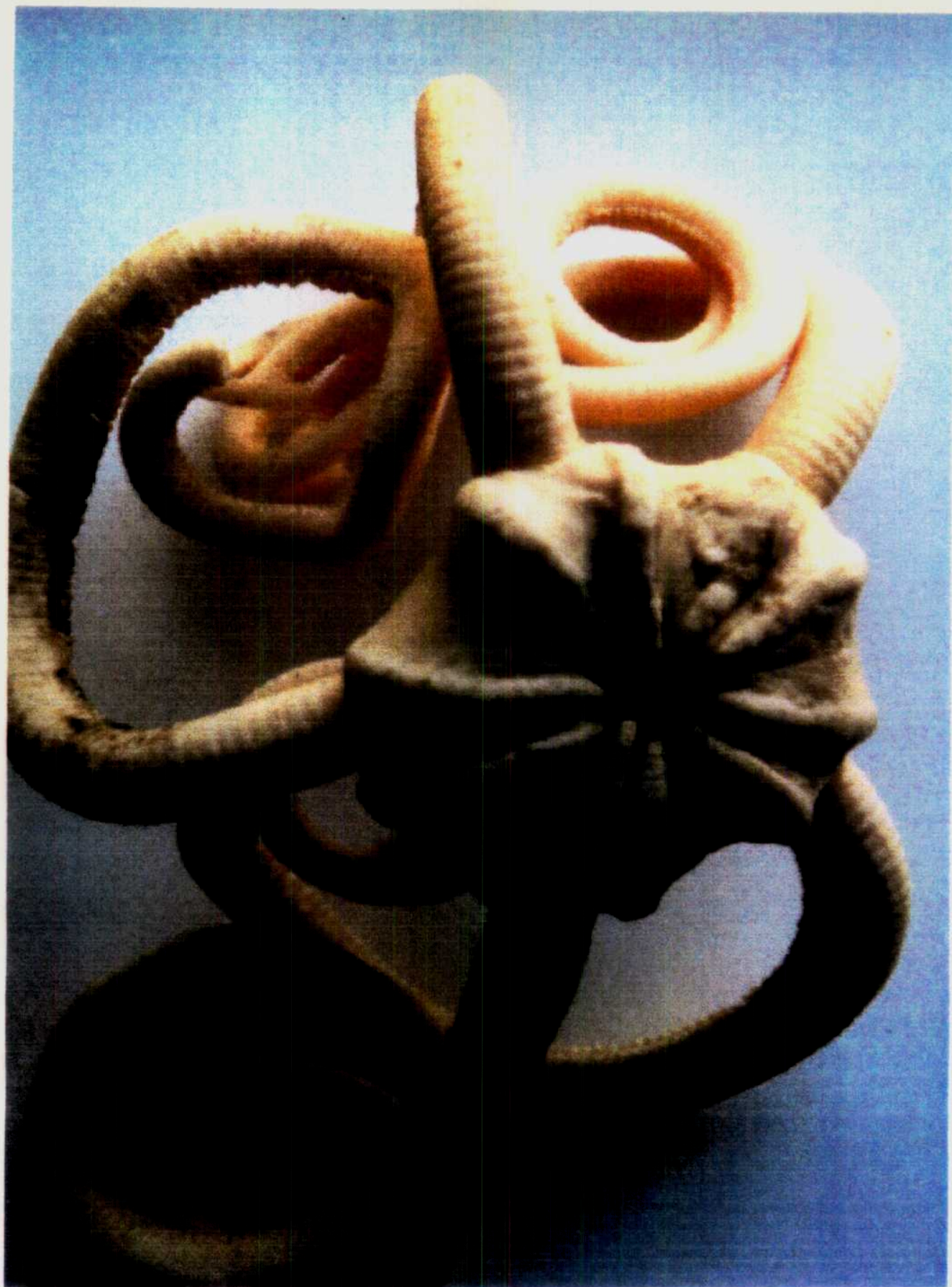
Dado que los compuestos {41} - {44} difieren sólo en la cadena lateral, los resultados obtenidos en estos ensayos indican la importancia del doble enlace Δ^{22} , presente en los compuestos {42} y {44}, en el efecto inhibitorio del virus sincitial respiratorio (RSV), así como del doble enlace $\Delta^{24(28)}$ en la replicación del virus Junín (JV).

TABLA 13. ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y CITOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *O. januarii*.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN μg/ml	HSV-1	ACTIVIDAD ¹ PV	ANTIVIRAL JV	RSV	ACTIVIDAD CITOTÓXICA ²
{41}	40	35,0 ± 0,7	30,0 ± 2,1	33,0 ± 3,5	25	-
	20	8,0 ± 1,8	24,0 ± 4,4	28,0 ± 1,0	25	-
	10	7,0 ± 0,6	0	26,0 ± 4,5	0	-
	5	2,0 ± 0,3	0	24,0 ± 0,7	0	-
{42}	40	39,0 ± 0,7	68,0 ± 1,4	47,0 ± 4,2	75	-
	20	14,0 ± 2,8	35,0 ± 1,4	36,0 ± 6,3	50	-
	10	0	0	31,0 ± 4,9	25	-
	5	0	0	15,0 ± 2,8	0	-
{43}	40	36,0 ± 0,7	31,0 ± 5,6	54,0 ± 2,1	50	-
	20	20,0 ± 6,6	16,0 ± 1,7	38,0 ± 3,5	25	-
	10	11,0 ± 2,1	0	33,0 ± 1,0	25	-
	5	3,0 ± 0,2	0	19,0 ± 3,0	0	-
{44}	40	36,0 ± 5,6	65,0 ± 7,7	37,0 ± 2,7	75	-
	20	12,0 ± 3,0	37,0 ± 2,1	29,0 ± 4,9	50	-
	10	0	8,0 ± 2,0	21,0 ± 1,3	0	-
	5	0	0	10,0 ± 0,5	0	-

¹ La actividad antiviral se expresa como reducción porcentual en la formación de placas para los virus HSV-1, polio y Junin ± la desviación standard y como reducción porcentual del efecto citopático para RSV. Los resultados son el promedio de 2 experimentos.

² - indica que no se observa citotoxicidad.



Astrotoma agassizii (Lyman, 1875)
(1:1)

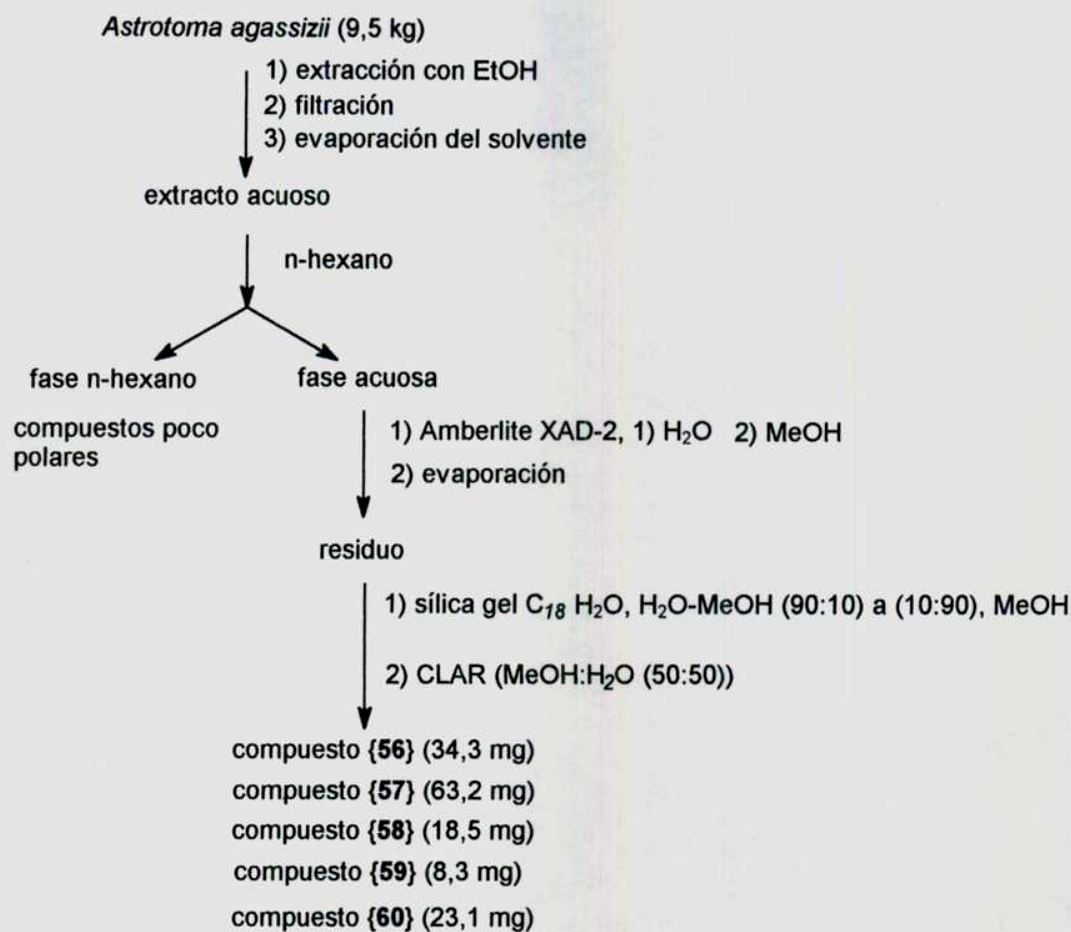
3.2 - ESTEROIDES SULFATADOS NOVEDOSOS DE *Astrotoma agassizii*

El ofiuro *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875) se colectó cerca de las Islas Georgias del Sur en febrero de 1994. Los organismos fueron clasificados por el Dr. Alejandro Tablado del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" en donde se preserva un ejemplar identificado como MACN N° 33.857. *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875) es una especie de la Península Antártica. Por su tamaño y aspecto puede figurar entre los ofiuros gigantes. Los especímenes estudiados en este trabajo tienen un diámetro de disco de 25 mm y una longitud aproximada de brazos de 50 cm. Los brazos son largos, no ramificados, gruesos en la base estrechándose gradualmente hacia la extremidad. *Astrotoma agassizii* es una especie vivípara y hermafrodita. Se distribuye en Chiloé, estrecho de Magallanes, Islas Malvinas, Georgias del Sur, extremo norte de la Península Antártica y Mar de Ross. Se trata de una especie circumpolar antártica y subantártica de amplia dispersión hacia el norte hasta 42°S por el océano Pacífico y 39°S por el Atlántico. Se han obtenido muestras de estos organismos a profundidades variables entre 74 y 1000 m.

EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Los organismos (9,5 kg) congelados inmediatamente después de su recolección fueron homogeneizados en EtOH (10 litros). El sólido se separó por filtración y el extracto etanólico se evaporó a presión reducida. El residuo acuoso así obtenido se extrajo con n-hexano. El extracto acuoso se percoló por una columna de Amberlite XAD (1 kg) eluyendo con agua hasta reacción negativa de cloruros, y luego con MeOH. El eluido metanólico se evaporó y el residuo se

purificó por cromatografía flash en columna de fase reversa (Davisil C₁₈, 35-75 μ) utilizando como solvente de desarrollo primero H₂O, luego mezclas H₂O - MeOH con cantidades crecientes de MeOH y finalmente MeOH (**esquema 2**).



Esquema 2

Se colectaron fracciones de 400 ml que fueron analizadas por ccd en fase normal (BuOH:AcOH:H₂O (4:1:5) (fase superior)) y reversa (MeOH:H₂O (65:35)) y detectadas por pulverización con H₂SO₄ y calentamiento en estufa. Las fracciones que contenían los esteroides sulfatados resultaron ser las de MeOH-H₂O (50:50) y (60:40). La purificación final se realizó por CLAR con una columna Bondclone C₁₈

con MeOH - H₂O (50:50). Se aislaron los compuestos {56} 34,3 mg, {57} 63,2 mg, {58} 18,5 mg, {59} 8,3 mg y {60} 23,1 mg.

Los esteroides {57} {58} y {59} resultaron novedosos, no así los compuestos {56} y {60} aislados con anterioridad del ofiuero antártico *Ophiosparte gigas*¹⁴⁹. Los compuestos {56} y {57} presentan un grupo sulfato en C-2. Esta característica es muy poco común en los esteroides polares aislados de ofiueros y en ese sentido el compuesto {56} de *Ophiosparte gigas*¹⁴⁹ es el único antecedente en literatura. Además, los compuestos novedosos {57}, {58} y {59} presentan un grupo isopropenilo en la cadena lateral y constituyen los primeros ejemplos de esta cadena en ofiueros.

El compuesto {57} (fig. 55) [α]_D -13,0° (c = 0.92 MeOH) muestra en su espectro FAB de iones negativos el ión cuasimolecular a m/z 597 [M(SO₃Na)(SO₃⁻)] y m/z 613 [M(SO₃K)(SO₃⁻)]. En su espectro RMN ¹³C (tabla 14) se observan 27 señales. Por medio de una secuencia DEPT se establece la presencia de un grupo -CH₂O- a δ 69,5 ppm (C-21), dos grupos -CH-OH a δ 78,3 y 69,5 ppm y dos dobles enlaces trisustituídos. Uno de los dobles enlaces corresponde a un grupo isopropenilo terminal según se establece por la presencia en el espectro RMN ¹H de dos metilos vinílicos a δ 1,61 y 1,65 ppm y la señal de un protón olefínico a δ 5,12 ppm (t, J = 6,7 Hz, H-24). Esta asignación se confirma en el espectro RMN ¹³C que muestra dos grupos metilo unidos a un carbono olefínico a δ 25,8 ppm (C-26) y 17,8 ppm (C-27) y dos carbonos olefínicos a δ 125,9 (C-24) y 132,0 ppm (C-25).

Además los espectros RMN ¹H y RMN ¹³C indican la presencia de un grupo sulfato en C-21 (δ_c 69,5; δ_H 3,97 (dd, J = 9,5; 6,2 Hz, H-21) y 4,18 ppm (dd, J = 9,5; 3,7 Hz, H-21)) y un segundo doble enlace trisustituído correspondiente a la posición 5(6) del esteroide (δ_H 5,34 m, δ_c 139,5 y 123,5 ppm).

El espectro COSY ^1H - ^1H permitió asignar las señales de todos los hidrógenos del anillo A y confirmó la presencia de funciones oxigenadas en C-2 y C-3. La ausencia de constantes de acoplamiento vecinales grandes permite establecer la estereoquímica relativa de los hidrógenos de C-2 y C-3 a δ 4,42 (d. a., $J = 2,5$ Hz, H-2 α) y δ 4,03 (d. a., $J = 2,5$ Hz, H-3 β), ambos en posición ecuatorial. La comparación de los desplazamientos químicos de C-1 y C-4 de **{57}** (C-1 39,0 ppm y C-4 35,8 ppm) con los de su isómero colest-5-eno-2 β ,3 α ,21-triol 3,21-disulfato¹³⁹ (C-1 40,1 ppm y C-4 33,5 ppm) sugiere la ubicación del grupo sulfato en C-2. Esta asignación se refuerza por el desplazamiento a campos bajos observada para el hidrógeno de C-3 (δ_{H} 5,1 ppm) en el derivado monoacetilado (**57b**). La configuración relativa del sustituyente hidroxilo en C-2 está de acuerdo con el desplazamiento inducido por el solvente sobre el metilo C-19 cuando se realiza el espectro RMN ^1H del derivado desulfatado **{57a}** en piridina ($\delta_{\text{piridina}} - \delta_{\text{metanol}} = +0,58$ ppm) debido a la interacción 1,3 diaxial entre el OH-2 y el metilo C-19. Se asigna la configuración 20R al compuesto **{57}** en base al desplazamiento químico de los hidrógenos del metileno C-21 del derivado desulfatado **{57a}**. En (20R)- y (20S)-colest-5-eno-3 β ,21-diol el isómero (20R) muestra un singlete a δ 3,70 (-CH₂OH) mientras que en el isómero (20S) se observa un multiplete centrado a δ 3,62 (CDCl₃, 60 MHz)¹⁴⁹. Las señales a δ 3,74 (dd, $J = 10,8; 4,4$ Hz) y δ 3,81 (dd, $J = 10,8; 3,0$ Hz) del derivado desulfatado (**57a**) (CDCl₃, 200 MHz) sugieren una configuración 20R.

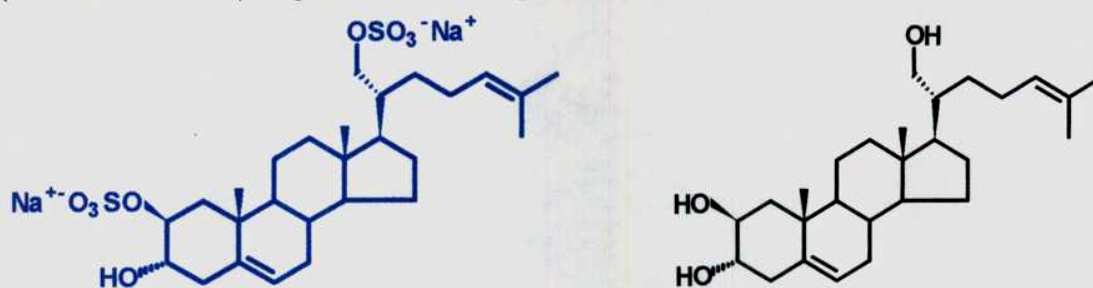


Fig. 55 - Compuestos {57} y {57a}

El compuesto **{56}** (**fig. 56**) presenta en su espectro FAB de iones negativos el ión cuasimolecular a m/z 599 $[M(SO_3Na)(SO_3^-)]$ y m/z 615 $[M(SO_3K)(SO_3^-)]$ correspondientes a una estructura de trihidroxicolestano disulfatado. Los espectros de RMN 1H y RMN ^{13}C (**tabla 14**) indican la presencia de una cadena de 21-sulfoxi-colestano y un doble enlace trisustituido (δ_H 5,34 m, δ_C 139,6 y 123,5) en posición 5(6).

Tabla 14. RMN ^{13}C de los esteroides {56} - {60}

Carbono	{56}	{57}	{58}	{59}	{60}
1	39,0	39,0	41,1	39,7	39,7
2	78,3	78,3	70,0	70,7	70,7
3	69,6	69,5	78,4	82,6	82,7
4	35,8	35,8	30,3	79,3	79,3
5	139,6	139,5	40,5	142,0	142,0
6	123,5	123,5	29,2	128,9	128,9
7	32,8	32,8	33,2	32,8	32,8
8	32,7	32,7	36,3	32,8	32,8
9	51,8	51,8	56,6	51,8	51,8
10	37,7	37,7	36,6	36,7	36,7
11	21,8	21,8	21,9	21,7	21,7
12	40,2	40,1	40,6	40,2	40,2
13	43,3	43,3	43,6	43,4	43,4
14	57,9	57,9	57,8	58,2	58,2
15	25,1	25,1	25,0	25,0	25,0
16	28,5	28,5	28,8	28,6	28,6
17	51,8	51,8	51,9	51,8	51,6

18	12,5	12,5	12,7	12,6	12,6
19	22,1	22,1	14,6	25,0	25,0
20	41,3	40,8	40,9	40,9	41,3
21	69,5	69,5	69,3	69,3	69,5
22	30,8	30,8	30,8	30,8	30,8
23	24,5	25,4	25,4	25,4	24,4
24	40,7	125,9	126,0	126,0	40,7
25	29,0	132,0	131,9	132,0	29,0
26	23,1	25,8	25,8	25,9	23,1
27	23,0	17,8	17,8	18,3	23,0

El espectro RMN ^1H de **{56}** contiene además dos señales de metinos a δ 4,02 (d. a., $J = 2,5$ Hz, H-3) y δ 4,42 (d. a., $J = 2,5$ Hz, H-2) acoplados entre sí. La orientación ecuatorial de los hidrógenos de C-2 y C-3 se establece en base a la ausencia de una constante de acoplamiento vecinal grande. El compuesto **{56}** es espectroscópicamente idéntico al aislado previamente de *Ophiosparte Gigas*¹⁴⁹. Este compuesto mostró actividad contra HIV-1 con EC_{50} entre 50-100 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁴⁷.

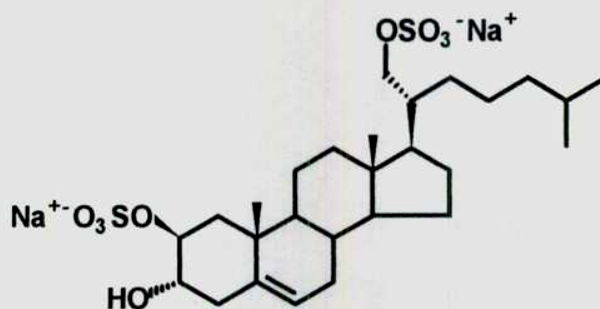


Fig. 56 - Compuesto **{56}**

El compuesto **{ 58 }** (**fig. 57**) $[\alpha]_D + 20,4^\circ$ ($c = 0,25$ MeOH) corresponde al análogo de colest-5-eno-2 β -3 α ,21-triol 3,21-disulfato¹³⁹ con un doble enlace trisustituído en la cadena lateral. En el espectro FAB de iones negativos de **{ 58 }** se observan los iones cuasimoleculares a m/z 599 $[M(SO_3Na)(SO_3^-)]$ y m/z 615 $[M(SO_3K)(SO_3^-)]$. El espectro de RMN ¹³C (**tabla 14**) contiene 27 señales. A través de una secuencia DEPT se establece la presencia de un grupo -CH₂O- a δ 69,3 ppm (C-21), dos carbonos de metinos oxigenados a δ 78,4 y 70,0 ppm y un doble enlace trisustituído. Además en el espectro RMN ¹H se observan dos metilos vinílicos a δ 1,61 y 1,65 ppm y un protón olefínico a δ 5,1 ppm (t, 6,7 Hz, H-24) que permiten establecer la posición del doble enlace en la cadena lateral ($\Delta^{24(25)}$). Los desplazamientos químicos en RMN ¹³C están de acuerdo con esta asignación (δ_{C-24} 126,0 ppm, δ_{C-25} 131,9 ppm).

El análisis del espectro COSY ¹H-¹H permitió la asignación de los protones del anillo A confirmando las posiciones oxigenadas de C-2 y C-3. Entre éstas, se asignó el grupo sulfato al C-3 dado que fue posible observar la correlación del hidrógeno axial de C-1 con los hidrógenos del metilo C-19 (δ 0,99) y con el hidrógeno ecuatorial de C-2 (δ 4,06). El otro hidrógeno sobre carbono oxigenado del anillo A se observa a δ 4,39 y pertenece al C-3 sulfatado.

Los hidrógenos de C-2 y C-3 se asignan ecuatoriales sobre la base de la ausencia de constantes de acoplamiento vecinales grandes. La ubicación del grupo sulfato en C-3 se confirma por el desplazamiento de la señal del hidrógeno de C-3 desde δ 4,39 (s. a.) en **{ 58 }** a δ 3,74 (s. a) en su derivado desulfatado.

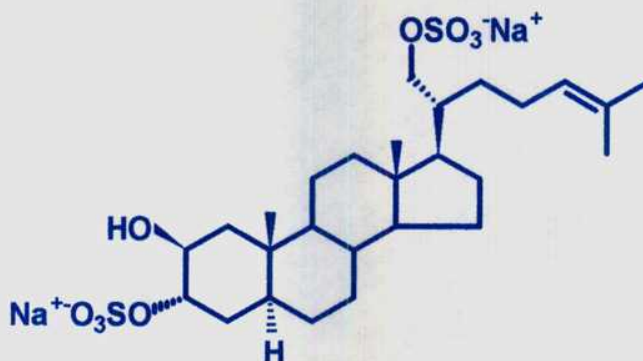


Fig. 57 - Compuesto {58}

Los esteroides más polares de *A. agassizii* {59} (fig. 58) y {60} (fig. 59) fueron caracterizados como (20R)-colesta-5,24-dieno-2 α ,3 α ,4 β ,21-tetraol 3,21-disulfato y su derivado saturado en posición 24. Este último {60}, fue aislado previamente del ofiuro *Ophiosparte Gigas*¹⁴⁹.

El compuesto {59} (fig. 58) [α]_D + 1,42° (c = 0,14 MeOH), muestra en su espectro FAB de iones negativos los iones cuasimoleculares a m/z 613 y m/z 629 correspondientes a las especies [M(SO₃Na)(SO₃⁻)] y [M(SO₃K)(SO₃⁻)], respectivamente. Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C confirman la presencia del grupo isopropenilo terminal (δ_{H-26} 1,61, δ_{C-26} 25,9; δ_{H-27} 1,66, δ_{C-27} 18,3; δ_{H-24} 5,09, δ_{C-24} 126,0; δ_{C-25} 132,0). El espectro RMN ¹³C contiene 27 señales que incluyen tres carbonos metínicos oxigenados a δ 70,3, 79,3 y 82,6 ppm y la señal del grupo -CH₂OSO₃⁻ a δ 69,3 ppm (C-21), según se estableció mediante una secuencia DEPT. La presencia del grupo sulfato en C-21 se confirma en el espectro RMN ¹H con las señales a δ 3,97 (d.d.) y δ 4,18 ppm (d.d.) acopladas entre sí con un J = 10 Hz. El espectro de RMN ¹H de {59} contiene las señales correspondientes a tres protones metínicos a δ 3,88, 4,26 y 4,42 ppm. A partir del espectro COSY ¹H-¹H se establece la correspondencia de estas señales con los hidrógenos de los carbonos 2, 4 y 3, respectivamente. Además, por irradiación de la señal del H-3 a

δ 4,42 se observa que el doblete correspondiente al H-4 a δ 4,26 (d, $J = 2,2$ Hz) se transforma en un singulete a δ 4,25. Por análisis de las constantes de acoplamiento se asignaron los hidrógenos de C-3 y C-4 como ecuatoriales ($J = 5,1; 2,2$ Hz). Para el H-2 se observa una constante de acoplamiento de $J = 6,8$ Hz con el H-1_{ax} que establece por tanto su orientación axial. El grupo sulfato se asigna en el C-3 por el desplazamiento a δ 4,42 ppm del hidrógeno de C-3 y por comparación con los valores de desplazamiento químico de los protones del anillo A con los de (20R)-colest-5-eno-2 α ,3 α ,4 β ,21-tetraol 3,21-disulfato {60}¹⁴⁹.

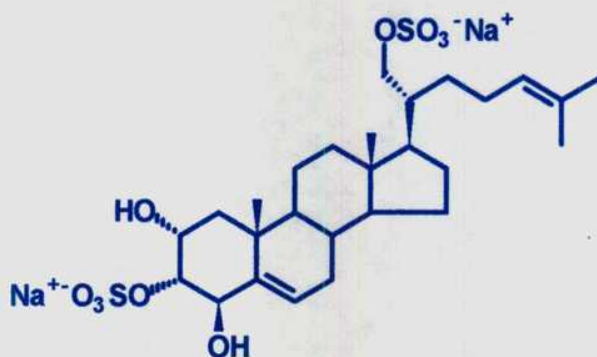


Fig. 58 - Compuesto {59}

El compuesto {60} (fig. 59) fue aislado previamente de *Ophiosparte gigas*¹⁴⁹ y demostró ser extremadamente citotóxico aún a una concentración de 0,12 μ g/ml¹⁴⁷. El espectro FAB de iones negativos muestra los iones cuasimoleculares de m/z 615 y 631 correspondientes a las especies $[M(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_3^-)]$ y $[M(\text{SO}_3\text{K})(\text{SO}_3^-)]$ respectivamente. El espectro RMN ¹H de {60} muestra señales a δ 3,93 (dd, $J = 10,0; 6,3$ Hz) y δ 4,18 (dd, $J = 10,0; 3,5$ Hz) indicativas de la presencia de un grupo sulfato en C-21. En el espectro de RMN ¹³C (tabla 13) se observan las señales de C-26 y C-27 a 23,0 y 23,1 ppm y la señal del grupo -CH₂OSO₃⁻ a 68,9 ppm. También se observan en el espectro RMN ¹H las señales de tres hidrógenos metínicos a δ 3,83 (m, H-2), 4,42 (dd, $J =$

5,1; 2,2 Hz, H-3) y 4,26 (d, $J = 2,2$ Hz, H-4). A partir del espectro COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ se observó que el doble doblete a δ 4,42 (H-3) está acoplado con las señales a δ 4,26 (H-4) y δ 3,83 (H-2). La señal a δ 3,83 (H-2) está acoplada también con un doble doblete a δ 1,83 con un $J = 6,8$ Hz correspondiente al H-1 axial. Los protones de C-3 y C-4 son asignados ecuatoriales dada la ausencia de acoplamientos vecinales grandes. El protón de C-2 se asignó axial por el J de 6,8 Hz con el hidrógeno axial de C-1. El grupo sulfato se asignó al C-3 por el desplazamiento a δ 4,42 del hidrógeno de C-3.

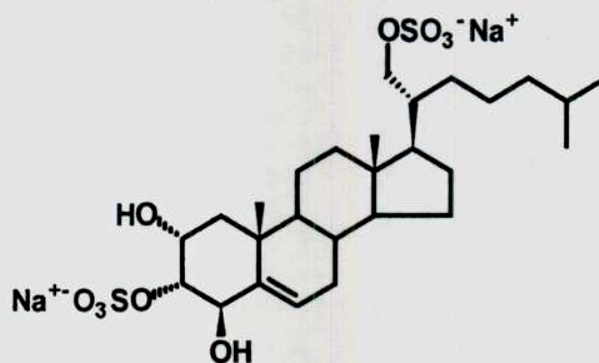
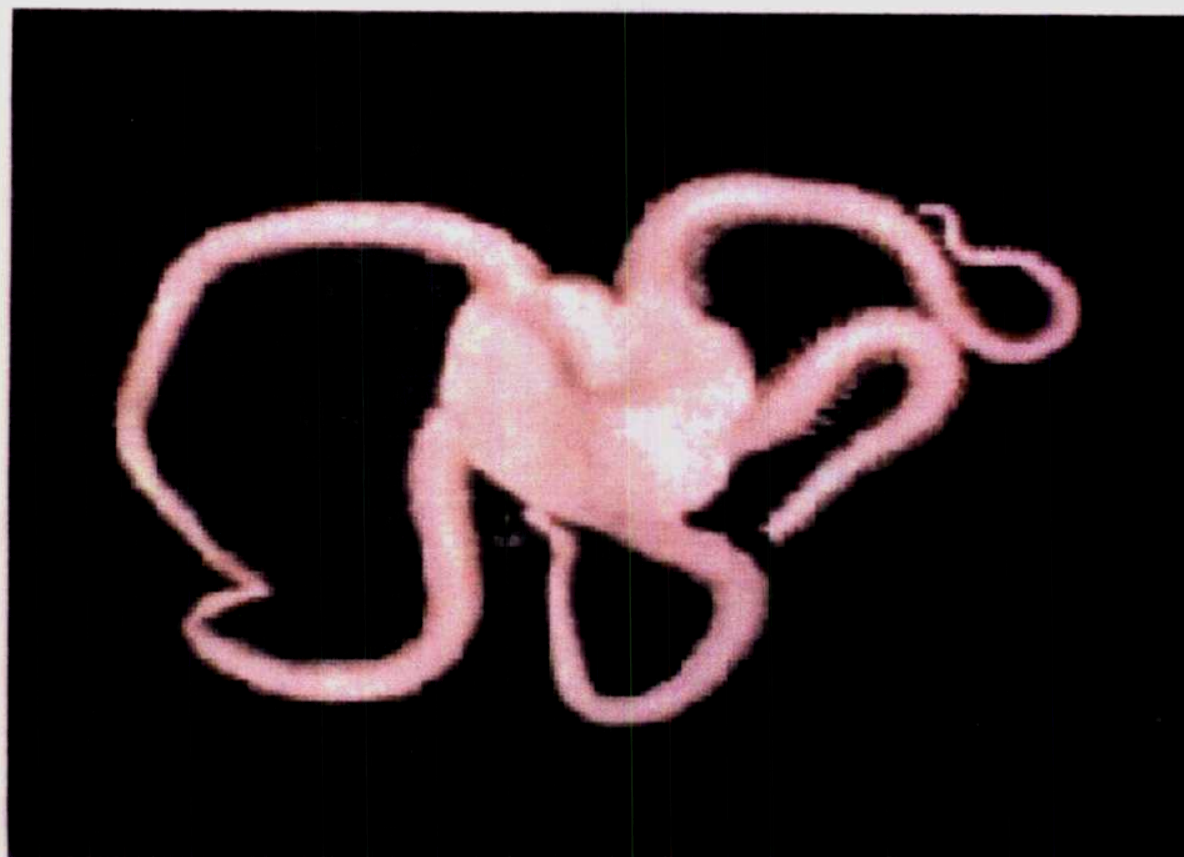


Fig. 59 - Compuesto {60}

Por otro lado, la purificación del extracto de n-hexano (24,4g) de *Astrotoma agassizii* por cromatografía en una columna de sílica gel utilizando mezclas de n-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente permitió aislar dos fracciones (hexano-acetato de etilo (50:50) y (40:60)) que contenían esteroides. La posterior purificación por C.L.A.R. de fase reversa (YMC-Pack ODS Rp-18, 20 x 250 mm, 5 μ , MeOH) de estas fracciones y análisis de los compuestos por C.G.L.-E.M. permitió identificar los esteroides mayoritarios de *Astrotoma agassizii* como colesterol, colest-5,22(E)-dien-3 β -ol y desmosterol (colest-5,24-dien-3 β -ol). La abundancia de desmosterol (32%) en la mezcla de esteroides de *Astrotoma agassizii* es llamativa ya que este esteroide no fue aislado de otros ofiuros⁶⁰. El

desmosterol podría ser el intermediario biosintético de los esteroides {57} {58} y {59} conteniendo la misma cadena lateral.



Ophionotus victoriae (Bell, 1902)
(1:1)

3.3 - ESTEROIDES POLIHIDROXILADOS SULFATADOS DE

Ophionotus victoriae

El ofiuro *Ophionotus victoriae* (Bell 1902) (0,6 kg) fue colectado en 1994 en Caleta Potter, muy cerca de la Base Jubany, Islas Shetland del Sur, Antártida. Los organismos fueron identificados por el Dr. Alejandro Tablado del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" donde se conserva una muestra identificada como MACN N° 31.240.

Ophionotus victoriae posee un disco circular, a veces algo pentagonal, brazos cortos, algo aplanados, estrechándose rápidamente hacia la extremidad. El color es por el lado dorsal amarillento rosado a gris, por el lado ventral, rosado. Los especímenes adultos tienen un diámetro entre 23 y 33 mm. Está distribuido en las islas Sandwich del Sur, Península Antártica e islas próximas, a profundidades entre 5 y 752 m.

ASLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Los organismos (0,6 kg) fueron homogeneizados y extraídos con MeOH (1 l). El residuo sólido se separó por centrifugación y se evaporó el solvente. El extracto se particionó entre n-hexano y agua y la fase acuosa se volvió a extraer con n-BuOH. El extracto butanólico se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por elución a través de una columna de Sephadex LH20 (80 cm x 4 cm d. i., MeOH) y se colectaron fracciones de 10 ml. Se controló el desarrollo de la columna por ccd sobre sílica gel (nBuOH-AcOH-H₂O 4:5:1) (fase superior) y sobre sílica de fase reversa (MeOH-H₂O (65:35)) revelando por pulverización con H₂SO₄. La fracción (30-50) contenía los esteroides polares y se purificó por CLAR a través de una columna Bondclone C₁₈ con MeOH:H₂O

(50:50). Se aislaron los compuestos {61} 3,3 mg, {62} 8,1 mg y una mezcla de los esteroides {57} y {63} 19,2 mg.

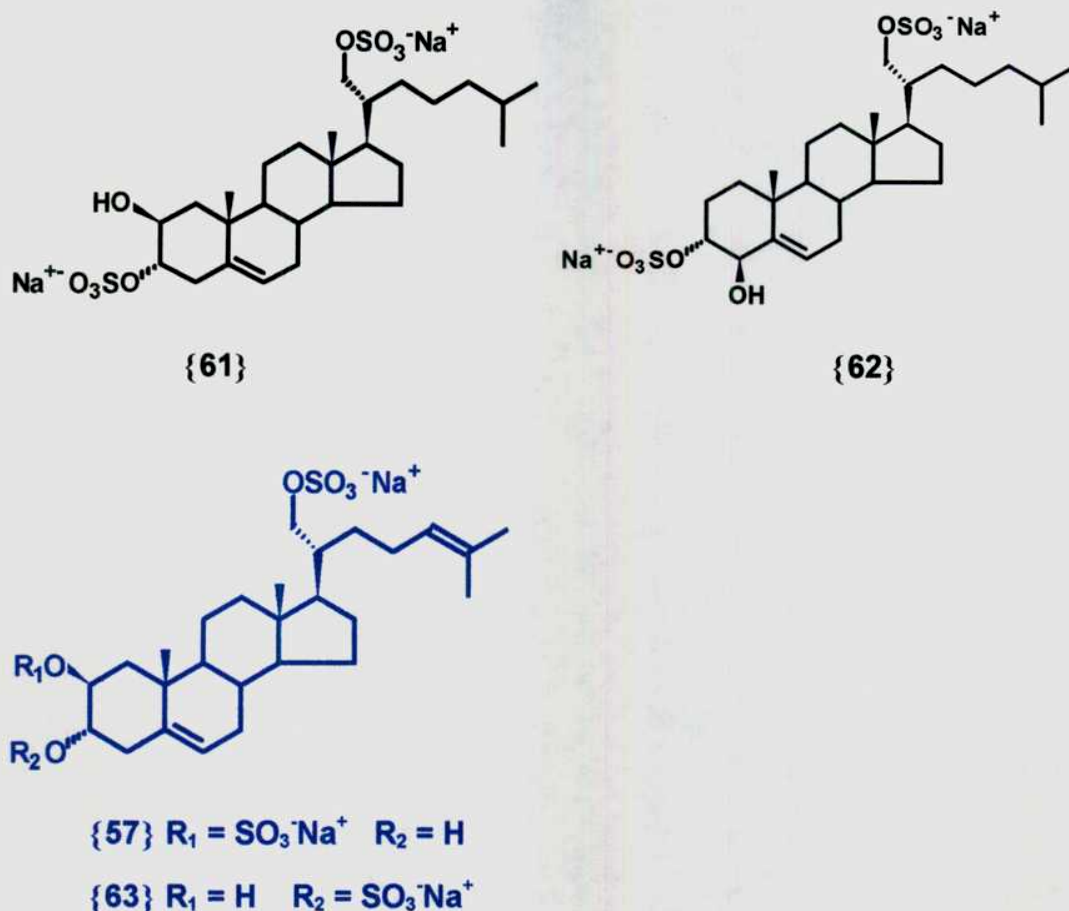


Fig. 60 - Compuestos aislados de *Ophionotus victoriae*.

El compuesto colest-5-eno-2 β ,3 α ,21-triol 3,21-disulfato {61} presenta en su espectro FAB de iones negativos los iones cuasimoleculares de m/z 599 $[\text{M}(\text{SO}_3\text{Na})(\text{SO}_3^-)]$ y 615 $[\text{M}(\text{SO}_3\text{K})(\text{SO}_3^-)]$ correspondientes a una estructura de trihidroxicolesteno disulfatado. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (tabla 15) indican la presencia de una cadena de 21-sulfoxicolestano y un doble enlace trisustituído (δ_{H} 5,34; δ_{C} 139,9 y 123,1) asignado a la posición C5-C6. Se observan además dos multipletes a δ 4,10 y 4,45 acoplados con un $J = 2,0$ Hz asignados a H-2 e H-3. Estos se asignan ecuatoriales por la ausencia de constantes de acoplamiento

vecinales grandes. Es muy interesante la comparación de los valores de δ_c de **{61}** (tabla 14) especialmente para los CH₂-1 y CH₂-4 con los del isómero (20R)-colest-5-eno-2 β ,3 α ,21-triol 2,21-disulfato **{57}** (CH₂-1: δ_c 39,0 ppm, CH₂-4: δ_c 35,8 ppm) aislado de *Ophiosparte gigas* y de *Astrofoma agasizii* en este trabajo. Estos valores refuerzan la asignación del grupo sulfato en C-3. El compuesto **{61}** fue aislado también de *Ophiotrix fragialis* y *Ophiura texturata*¹³⁹.

Tabla 15. RMN ¹³C de los compuestos {61}, {62} y {63} + {57}

Carbono	{61}	{62}	{63} + {57}	
C-1	40,1	33,6	40,3	39,0
C-2	69,5	24,4	69,5	78,3
C-3	78,9	78,5	79,2	69,5
C-4	33,5	76,7	33,7	35,8
C-5	139,9	142,2	139,8	139,5
C-6	123,1	129,7	123,1	123,5
C-7	32,9	33,2	32,8	32,8
C-8	32,8	33,2	32,7	32,7
C-9	51,9	51,9	51,8	51,8
C-10	37,5	37,3	37,5	37,7
C-11	21,9	21,4	21,9	21,8
C-12	41,1	40,3	41,2	40,1
C-13	43,3	43,3	43,4	43,3
C-14	58,1	58,3	58,0	57,9
C-15	25,2	25,2	25,1	25,1
C-16	28,7	28,6	28,6	28,5
C-17	51,6	51,6	51,6	51,8
C-18	12,5	12,5	12,6	12,5

C-19	22,6	21,5	22,6	22,1
C-20	41,4	41,4	40,9	40,8
C-21	69,5	69,5	69,4	69,4
C-22	30,9	30,9	30,8	30,8
C-23	24,4	24,4	25,4	25,4
C-24	40,8	40,8	126,0	125,9
C-25	29,1	29,1	132,1	132,0
C-26	23,2	23,2	25,9	26,0
C-27	23,0	23,0	17,8	17,8

El compuesto **{62}** muestra en su espectro FAB de iones negativos las señales correspondientes al ión molecular a m/z 599 $[M(SO_3Na)(SO_3^-)]$ y 615 $[M(SO_3K)(SO_3^-)]$. El espectro de RMN 1H muestra las señales indicativas de un grupo sulfoxi de C-21 (δ 3,94 (dd, 10,0; 6,5 Hz); δ 4,20 (dd, 10,0; 3,7 Hz)), una señal de un hidrógeno olefínico a δ 5,61 (1H, d.a., 3,8 Hz) y dos señales de metinos oxigenados a δ 4,16 (1H, da, $J = 2,7$ Hz, H-4) y δ 4,48 (1H, c, $J = 2,7$ Hz, H-3). Las constantes de acoplamiento pequeñas del H-3 son consistentes con su orientación ecuatorial y su desplazamiento a δ 4,48 ppm está de acuerdo con la ubicación del grupo sulfato en esa posición. La configuración axial (β) del grupo hidroxilo de C-4 se justifica por el desplazamiento a campos bajos del metilo C-19 (δ_H 1,19) y del hidrógeno olefínico (δ_H 5,61) consistente con una función hidroxilo axial. El espectro de RMN ^{13}C de **{62}** es consistente con una estructura colest-5-eno-3 α ,4 β ,21-triol 3,21-disulfato. Se destacan los carbonos 5 y 6 a δ 142,2 y 129,7 ppm, respectivamente y los carbonos oxigenados (δ_{C-3} 78,5 δ_{C-4} 76,7 δ_{C-21} 69,5 ppm). El compuesto **{62}** fue aislado por primera vez por el grupo del Dr. Stonik del ofiuro *Ophiura sarsi*¹³⁸ y luego por Minale y col. de *Ophiotrix fragilis*, *Ophiura texturata* y *Ophionotus victoriae*¹³⁹.

En nuestro extracto de *Ophionotus victoriae* pudimos aislar además una mezcla de los compuestos isómeros {57} y {63}, la cual no pudo ser separada por CLAR. El compuesto {57} fue aislado como compuesto puro del ofiuro *Astrofoma agassizii* (Lyman, 1875) y se discutió en el capítulo correspondiente a ese organismo. Ambos compuestos resultaron de estructura novedosa. El espectro FAB de iones negativos de la mezcla {57} + {63} presenta señales correspondientes a los iones moleculares a m/z 597 [$M(SO_3Na)(SO_3^-)$] y 613 [$M(SO_3K)(SO_3^-)$]. En el espectro de RMN ^{13}C de {57} + {63} (tabla 14) se observa una señal correspondiente a un grupo CH_2-O- (DEPT) a δ 69,4 ppm (C-21) y tres señales correspondientes a metinos oxigenados a δ 69,5 (C-2 de {63} y C-3 de {57}), δ 79,2 ppm (C-3 de {63}) y δ 78,3 ppm correspondiente al C-2 de {57}. Se observan además las señales de dos dobles enlaces trisustituídos. Dos carbonos olefínicos corresponden a un grupo isopropenilo terminal según se establece por la presencia en RMN 1H de dos metilos vinílicos a δ 1,61 y 1,65 ppm y un triplete de un hidrógeno de olefina a δ 5,1 (t, $J = 7$ Hz, H-24). Además en el espectro de RMN ^{13}C aparecen dos carbonos de metilos unidos a carbono olefínico a δ 25,9 (C-27) y 17,8 (C-26) y los carbonos del doble enlace a δ 126,0 (C-24) y 132,1 (C-25). Se observan además los carbonos olefínicos del doble enlace Δ^5 a δ 139,8 (C-5) y 123,1 (C-6) en {63} y δ 139,5 (C-5) y 123,5 (C-6) en {57}. Los valores de los desplazamientos químicos de los hidrógenos de C-2 y C-3 de {57} se superponen con H-3 e H-2 de {63}, respectivamente. La superposición de señales impide establecer las constantes de acoplamiento de los hidrógenos de C-2 y C-3. Se sugiere la orientación ecuatorial de estos hidrógenos por analogía con otros esteroides polihidroxilados aislados de ofiuros.

En febrero de 1995 se publicó en el *Journal of Natural Products* un trabajo que incluía el estudio químico de *Ophionotus victoriae*¹³⁹. Los organismos

estudiados también fueron recolectados en la Antártida, durante la expedición Italiana de 1989/90. En ese trabajo, sin embargo, no se informan los compuestos {57} y {63}.

3.4 - AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POLARES DE *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816)

El ofiuro tropical *Ophiocoma echinata* fue recolectado en la bahía de Neguange a 0,5-1 m de profundidad y clasificado por el Dr. Sven Zea del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín (INVEMAR), Santa Marta, Colombia.

Los organismos, congelados tras su recolección, fueron extraídos con metanol. El solvente fue concentrado y el residuo acuoso resultante se extrajo con n-hexano.

El extracto acuoso fue extraído con n-butanol. Se purificó por cromatografía flash en columna seca de Davisil C₁₈ (35-75 μ) eluyendo sucesivamente con agua, mezclas de MeOH-H₂O con cantidades crecientes de MeOH y MeOH. Se colectaron fracciones de 100 ml que fueron analizadas por ccd de fase normal y reversa. La fracción que contenía los esteroides sulfatados se purificó por CLAR utilizando una columna Bondclone C-18 con MeOH-H₂O (50:50) para dar los compuestos: 5 β -colest-3 α ,4 α ,11 β ,12 β ,21-pentol 3,21-disulfato (14,2 mg) **{64}**, una mezcla que contiene a **{64}** y 5 β -colest-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol 3,21-disulfato **{41}** y 4,8-dimetilnon-3-eno 1-sulfato **{65}** (10,6 mg).

ESTEROIDES POLIHIDROXILADOS SULFATADOS DE *Ophiocoma echinata*

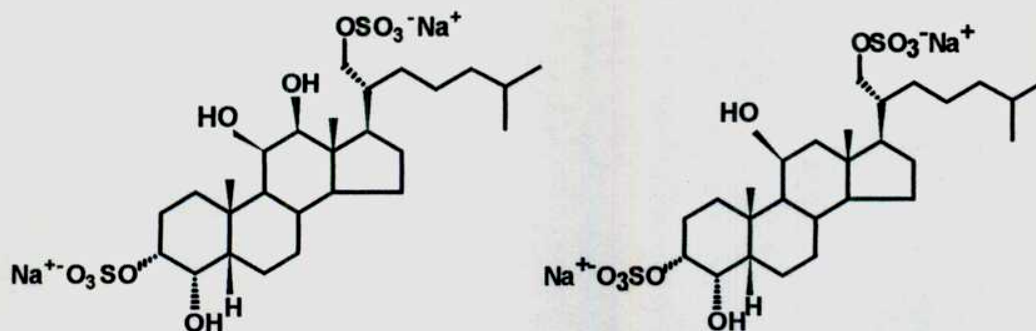


Fig. 61 - Compuestos **{64}** y **{41}**

El compuesto **{64}** había sido aislado previamente de *Ophioderma longicaudum*⁶⁰ y el compuesto **{41}** fue aislado por primera vez de *Ophiocoma dentata*¹³⁵ y luego de *Ophioplocus januarii* en este trabajo.

Aislados estos compuestos, en febrero de 1995 apareció publicado un trabajo en el *Journal of Natural Products*¹³⁹ donde se estudia este mismo organismo colectado en las Islas Bahamas, cerca de la Isla San Salvador. En ese trabajo se informa el aislamiento de los compuestos **{64}**, **{41}** y un tercer esteroide **{66}** (fig. 62) que no encontramos en nuestro extracto.

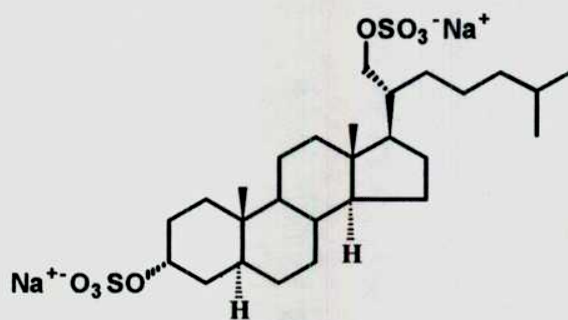


Fig. 62 - Compuesto **{66}**

En el espectro FAB de iones negativos del compuesto **{64}** se observan los iones moleculares de m/z 649 y 633 correspondientes a las sales de potasio y de sodio del dianión respectivamente. Se observan además picos de m/z 531 y 513 correspondientes a las pérdidas de $\text{KSO}_3(+\text{H})$ y KHSO_4 a partir de 649 y NaSO_3 y NaHSO_4 a partir de 633. El espectro de RMN ^{13}C muestra 27 carbonos (parte experimental). En el espectro RMN ^{13}C se observan los metilos C-26 y C-27 a δ 23,0 y 23,1 ppm, los metilos C-18 y C-19 a δ 10,5 y 27,5 ppm y los carbonos oxigenados C-4, C-11 y C-12 a δ 75,2, 73,4 y 81,2 ppm, respectivamente. En el espectro de RMN ^1H se observan 4 metilos a δ 0,86 (3H, s, H_3 -18), 0,88 (6H, d, $J = 6,5$ Hz, H_3 -26 y H_3 -27) y 1,15 (3H, s, H_3 -19). La señal de uno de los hidrógenos del metileno de C-21 (sistema ABX) aparece a δ 4,03 (dd, J

= 9; 5,5 Hz). El otro hidrógeno correspondiente a la porción A del sistema ABX se superpone con la señal del H-3 a δ 4,15 ppm. La hidroxilación en C-26 se descarta por la presencia en el espectro de RMN ^{13}C de las señales a 23,0 (C-26) y 23,1 ppm (C-27). En el espectro de RMN ^1H se observa un doblete a δ 3,24 (1H, $J = 3,5$ Hz) y un triplete a δ 3,95 ppm (1H, $J = 3,5$ Hz). Estos hidrógenos están acoplados entre sí y en consecuencia conforman un sistema de dos carbonos hidroxilados vecinos. Sobre la base de las multiplicidades de las señales de ambos protones, uno de los carbonos oxigenados debe estar vecino a un grupo -CH y el otro a un carbono cuaternario, lo cual corresponde en un esqueleto esteroideal a las posiciones C-11 y C-12 respectivamente, como única posibilidad⁶⁰. Por último, las señales de los metilos angulares en el espectro de RMN ^{13}C a δ 10,5 (CH₃-18) y δ 27,0 ppm (CH₃-19) son indicativos de la fusión en *cis* de los anillos A/B.

El compuesto **{41}** se identificó por comparación de los espectros de RMN ^{13}C y ^1H de la mezcla de **{64}** + **{41}** con los de los compuestos puros aislados de *Ophiocoma echinata* y *Ophionotus januarii*, respectivamente (C-11 δ 73,4 en **{64}** y 68,9 en **{41}**; C-12 δ 81,2 en **{64}** y 49,6 en **{41}**). El espectro FAB de iones negativos de la mezcla muestra los iones moleculares de m/z 617, 633 y 649 correspondientes a las sales de sodio del dianión de **{41}** y **{64}** y la sal de potasio del dianión de **{64}**, respectivamente.

UN ALQUENO SULFATADO NOVEDOSO DE *Ophiocoma echinata*

En 1990 Findlay *et al.*¹⁵⁰ aislaron de la estrella de mar *Asterias forbesi* un glicolípido sulfatado, Forbesin (**fig. 63**), y la sal disódica de la aglicona del mismo (eicosano-1,16-disulfato). Este constituye el primer informe de este tipo de compuestos en un organismo marino.

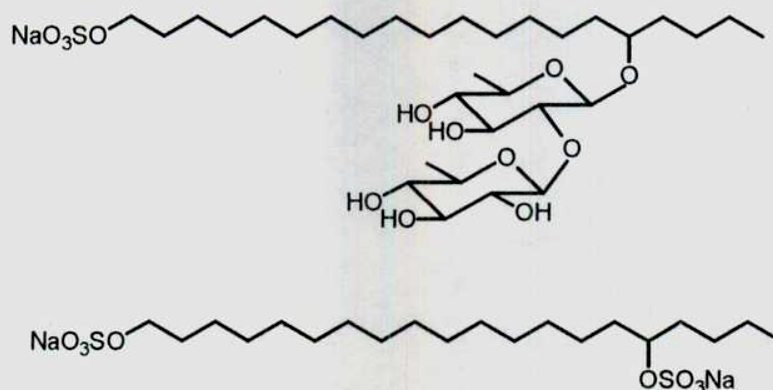


Fig. 63 - Forbesin, glicolípido sulfatado de *Asterias forbesi* y la sal disódica de su aglicona.

Un año después, nuevamente Findlay *et al.*¹⁵¹ aislaron dos hidrocarburos sulfatados del pepino de mar *Cucumaria frondosa* (**fig. 64**).

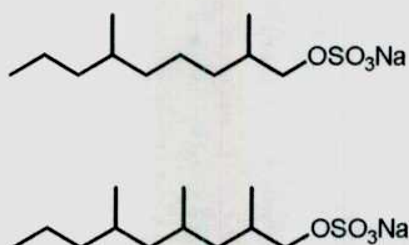


Fig. 64 - Hidrocarburos sulfatados de *Cucumaria frondosa*.

Fusetani *et al.*^{152, 153} en 1993 aislaron de la esponja *Toxadocia cylindrica*, cuyo extracto hidrofílico mostraba potente actividad contra Trombina, tres aldehídos sulfatados llamados Toxadocial A, B y C (**fig. 65**) y un análogo de Toxadocial A donde el aldehído de C-23 está oxidado a ácido, el ácido Toxadoico.

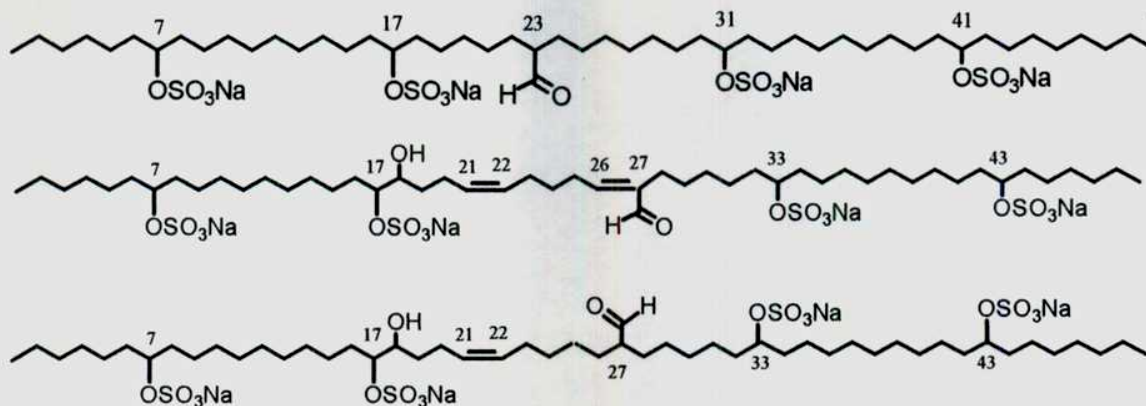


Fig. 65 - Toxadocial A B y C, aldehídos sulfatados de *Toxadocia cylindrica*.

En noviembre de 1994, dos grupos informan en forma independiente el aislamiento y caracterización de un monoterpeno sulfatado a partir del extracto de las ascidias *Polycitor adriaticus*¹⁵⁴ y *Halocynthia roretzi*, respectivamente¹⁵⁵.



Fig. 66 - Alqueno sulfatado aislado de las ascidias *Polycitor adriaticus* y *Holocynthia roretzi*

De esta última¹⁵⁵ se pudieron caracterizar además dos dienos y un trieno sulfatados novedosos (**fig. 67**).

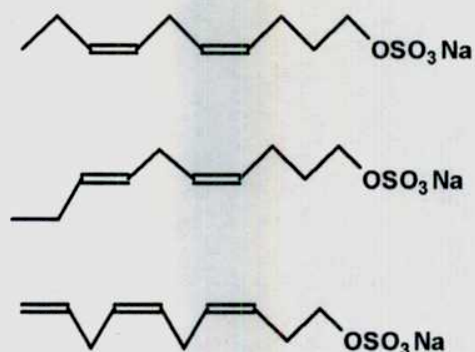


Fig. 67 - Alquenos sulfatados de *Halocynthia roretzi*.

El estudio de las fracciones de CLAR de *Ophiocoma echinata* permitió aislar un compuesto no esteroidal de polaridad suficiente para eluir junto con la fracción de esteroides disulfatados.

El espectro FAB de iones negativos (**fig. 68**) del compuesto **{65}** (**fig. 70**) presenta el ión molecular $[M - Na]^-$ a m/z 249 y el espectro FAB de iones positivos (**fig. 69**) los iones $[MNa + Na]^+$ a m/z 295 y $[MNa + K]^+$ a m/z 311. En el espectro de RMN ^{13}C (**tabla 16**) se observan 11 señales correspondientes según el experimento DEPT a tres metilos, (uno de ellos sobre doble enlace (δ_c 23,6)), cinco metilenos, dos metinos y un carbono olefínico cuaternario. La presencia de un metileno a δ_c 68,8 ppm y un triplete a δ_H 3,92 ($J = 7$ Hz) sugiere la presencia de un grupo sulfato.

Tabla 16 - RMN ^{13}C y RMN ^1H del compuesto {65}

RMN ^{13}C			RMN ^1H
C1	68,8	H-1	3,92 (2H, t, J = 7 Hz)
C2	29,0	H-2	2,36 (2H, c.a., J = 7 Hz)
C3	121,0	H-3	5,2 (1H, t.a., J = 7 Hz)
C4	139,3	---	---
C5	32,9	H-5	2,0 (2H, t, J = 7 Hz)
C6	26,8	H-6	1,37 (2H, m)
C7	40,0	H-7	1,22, (2H, m)
C8	29,1	H-8	1,58 (1H, m)
C9	23,0	H-9	0,88 (6H, J = 6,6 Hz)
C10	23,6	H-10	1,68 (3H, s.a.)
C11	23,0	H-11	0,88 (6H, J = 6,6 Hz, H-11)

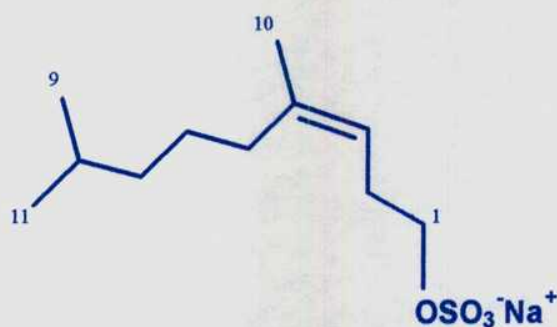


Fig. 70 - Compuesto {65}

El espectro IR de {65} presenta una banda a 1215 cm^{-1} que confirma la presencia de un grupo sulfato. La alta polaridad del compuesto {65} se explica por la presencia de este grupo funcional.

File:ROCATTAGLIATA Ident:23 27-7 10 Mer Def 0.25 Acq:13-DEC-1995 14:51:35 +4:26 Cal:ROCATTAGLIA»
ZAB-SEQ4F FAB- Magnet BpM:249 BpI:10148261 TIC:15902803 Flags:NORM

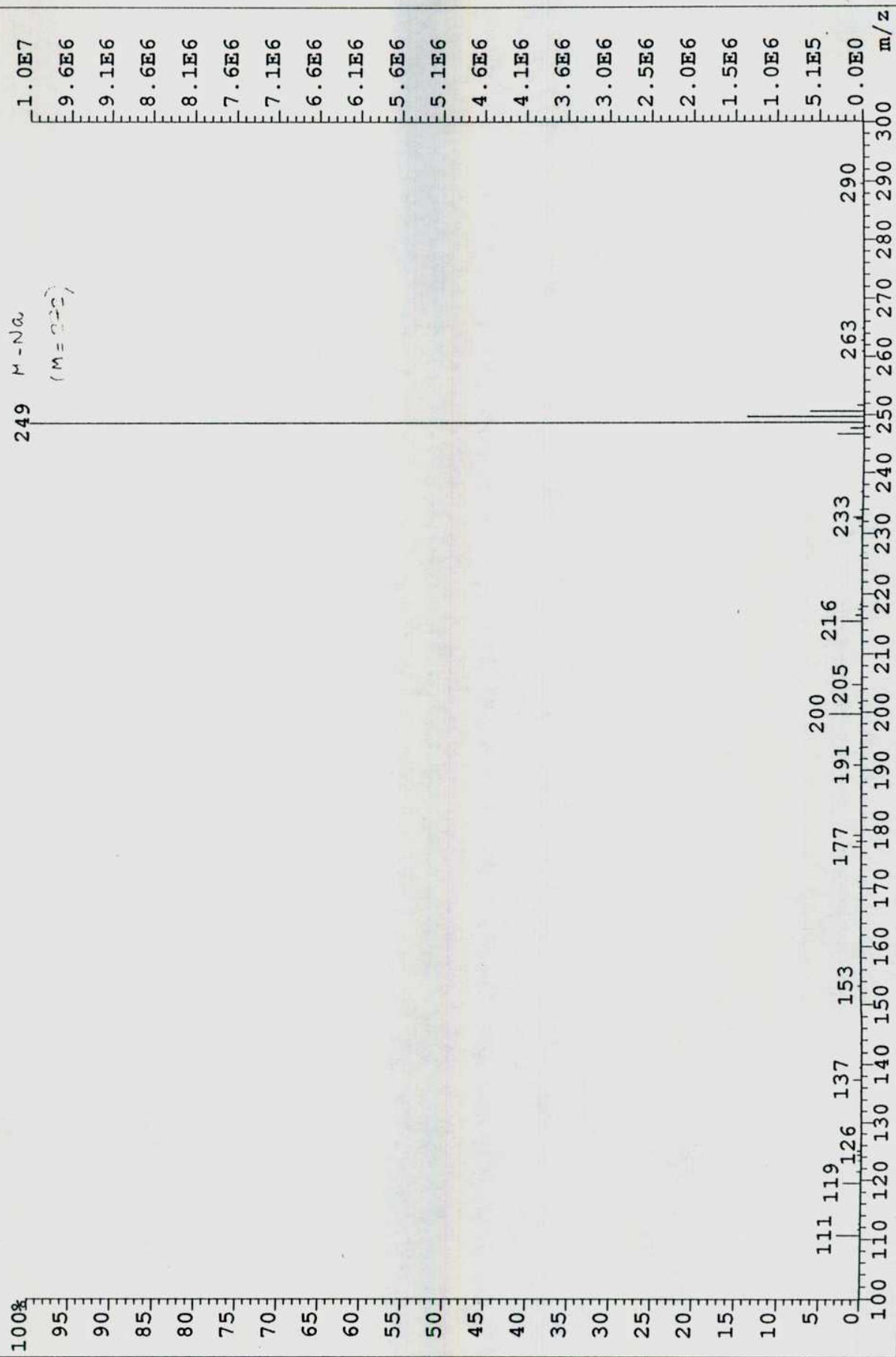


Fig. 68 - Espectro FAB del compuesto {65}

File:ROCCA Ident:25_30-9_12 Mer Def 0.25 Acq:14-AUG-1996 16:13:26 +3:29 Cal:ROCCA
ZAB-SEQ4F FAB+ Magnet BpM:143 BpI:1736157 TIC:15031134 Flags:NORM

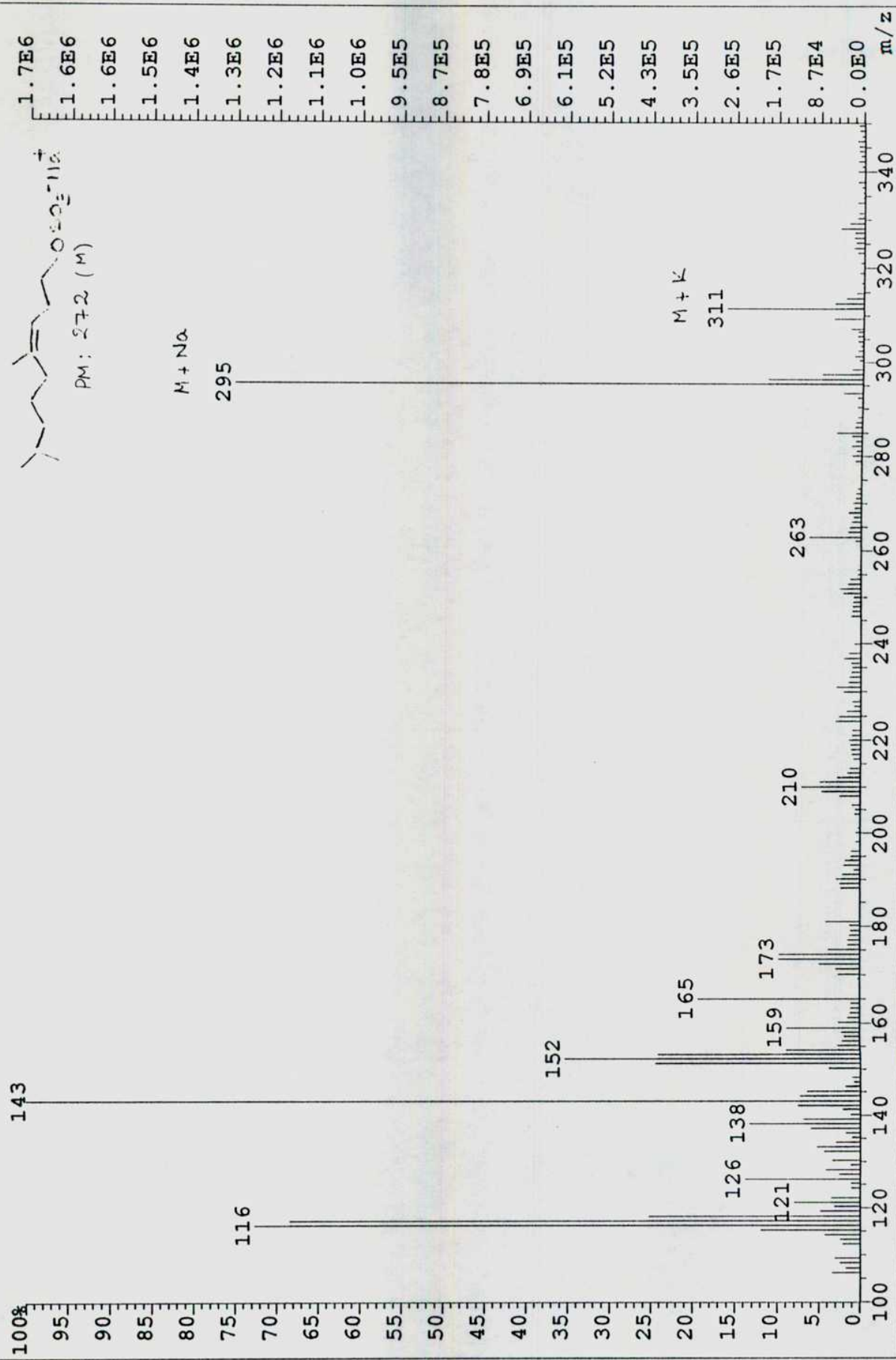


Fig. 69 - Espectro FAB⁺ del compuesto {65}

En el espectro de RMN ^1H (fig. 71) se observa un doblete a δ 0,88 (6H, $J = 6,6$ Hz, $\text{H}_3\text{-9}$ y $\text{H}_3\text{-11}$). De acuerdo con el espectro COSY $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ estos dos grupos metilo están acoplados con un metino a δ 1,58 (1H, m, H-8) conformando un grupo isopropilo. El metino a δ 1,58 correlaciona a su vez con un metileno a δ 1,22 ppm (2H, m, $\text{H}_2\text{-7}$).

A partir del espectro COSY $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ fue posible correlacionar la señal del grupo metilo unido a un carbono olefínico (δ_c 23,6) con el singulete ancho a δ 1,68 ppm ($J_{\text{alílico}} = 1,5$ Hz)

En el espectro de RMN ^1H se observa el H-1 como un triplete a δ 3,92 (2H, $J = 7$ Hz) que correlaciona en el COSY $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ con un doble cuarteto a δ 2,36 (2H, c.a., $J = 7$ Hz, H-2). El H-2 está acoplado con el metilo C-10 a δ 1,68 y con el triplete ancho a δ 5,17 (H-3).

La posición del grupo metilo en C-4 se establece por la multiplicidad de las señales de H-2 e H-5 y la correlación de los $\text{H}_2\text{-5}$ y del metilo C-10 en el espectro NOESY.

La geometría Z del doble enlace se deduce a partir de la correlación del H-2 con H-5 y del hidrógeno olefínico (H-3) con el metilo 10 en el espectro NOESY. Además, el valor de δ_c 23,6 del metilo 10 confirma la estereoquímica Z del doble enlace (efecto γ)^{156, 157}. El alqueno sulfatado descrito es el primer ejemplo en literatura del aislamiento de este tipo de compuestos en ofiuros.

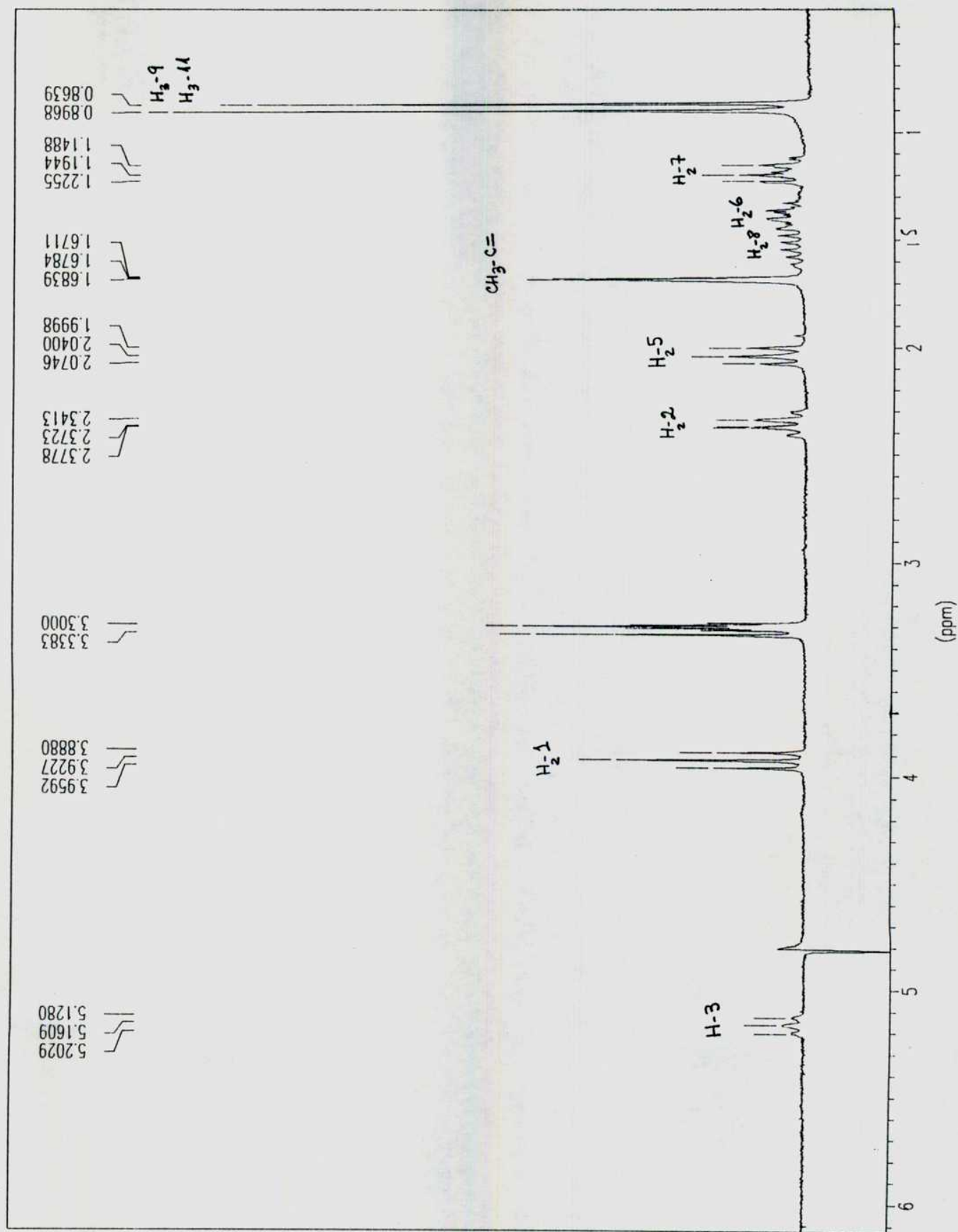


Fig. 71 - RMN ¹H del compuesto { 65 }

El presente trabajo dio origen a las siguientes publicaciones:

- 1 - "Two novel steroidal glycoside sulfates from the starfish *Cosmasterias lurida*". Marta S. Maier, Alejandro J. Roccatagliata and Alicia M. Seldes. *J. Nat. Prod.*, **56**, (6), 939-942 (1993).
- 2 - "Starfish saponins. Part 2. Steroidal Oligoglycosides from the starfish *Cosmasterias lurida*". Alejandro J. Roccatagliata, Marta S. Maier, Alicia M. Seldes, Maria Iorizzi and Luigi Minale. *J. Nat. Prod.* **57**, (7), 747-754 (1994).
- 3 - "Aislamiento de esfingolípidos de la estrella de mar *Cosmasterias lurida*". Marta S. Maier, Marina G. Pérez, Alejandro Roccatagliata y Alicia Seldes. *Memorias del XX Congreso Latinoamericano de Química*. *Revista Copaqui* **15**, 973-980 (1995).
- 4 - "A novel marine steroidal sulfate from the starfish *Luidia ludwigi*". Alejandro J. Roccatagliata, Marta S. Maier, and Alicia M. Seldes. *J. Nat. Prod.* **58**, (12), 1941-1944 (1995).
- 5 - "Main sterols from the echinoid *Encope emarginata*", Marina G. Pérez, Alejandro J. Roccatagliata, Marta S. Maier, Alicia M. Seldes and Juan M. Díaz de Astarloa. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 115-118 (1996).
- 6 - "Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*". Alejandro J. Roccatagliata, Marta S. Maier, Alicia M. Seldes, Carlos A. Pujol and Elsa B. Damonte. *J. Nat. Prod.* **59**, (9), 887-889 (1996).
- 7 - "Main sterols from the starfish *Luidia ludwigi*". Alejandro J. Roccatagliata, Marta S. Maier and Alicia M. Seldes. *Anales Asoc. Quím. Argent.* En prensa.
- 8 - A new sulfated alkene from the ophiuroid *Ophiocoma echinata*. Alejandro J. Roccatagliata, Marta S. Maier, Alicia M. Seldes, Sven Zea and Carmenza Duque. Enviado al *J. Nat. Prod.*.

Parte experimental

INSTRUMENTOS Y METODOS EMPLEADOS

Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin Elmer 141 empleando una lámpara de sodio ($\lambda=589$ nm), en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración que se indica en cada caso.

Las cromatografías gas-líquido fueron realizadas en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 A que contaba con detector de ionización de llama (FID) y se utilizó nitrógeno como gas portador. Las condiciones y columnas empleadas se indican en cada caso.

Fueron utilizadas las siguientes columnas capilares:

- 1) **HP-5** (long. 25 m, 0,2 mm d.i)
- 2) **SP-2330** (long. 15 m, 0,25 mm d.i.)
- 3) **Ultra-2** (long. 50 m, 0,2 mm d. i.)

Para las cromatografías gas-líquido acopladas con espectrometría de masa se utilizó helio como gas portador y se empleó la columna:

- 4) **HP-5** (long. 25 m, 0,2 mm d.i)

Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masa (CGL-EM) fueron realizadas en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890A acoplado a un espectrómetro de masa Trio-2 VG Masslab, ionizando por impacto electrónico a 70 eV.

Los espectros de masa (FAB/EM) fueron efectuados en un espectrómetro de masa VG-ZAB híbrido BEqQ (B: sector magnético, E: sector eléctrico, q: cuadrupolo solo radiofrecuencia, Q: cuadrupolo), siendo la sección BE de alta resolución de simetría reversa. El instrumento fue operado tanto en modo de iones positivos como negativos.

La ionización por FAB fue efectuada utilizando una pistola de iones cesio (Cs) a 40 kV y calibración de masas utilizando Csl. La muestra se disolvió en MeOH (1 mg/ml) y una pequeña cantidad de la muestra (1-2 μ l) se mezcló con la matriz. Las especies protonadas fueron desorbidas de una matriz de glicerol, mientras que las especies cationizadas fueron analizadas como derivados de sodio, potasio y litio. El voltaje de aceleración fue de 8 kV.

Las especies cationizadas fueron todas desorbidas de una matriz de alcohol m-nitrobencílico y 15 % de glicerol, saturada con Lil para obtener las especies litiadas, NaI ó Na₂CO₃ para obtener especies cationizadas con sodio y KI para obtener las especies cationizadas con potasio. El análisis de iones negativos se realizó como especies anionizadas desorbidas de una matriz de trietanolamina. El voltaje de aceleración fue de 8 kV.

Los espectros ESP se realizaron en un instrumento VG Platform (cuadrupolo) operando en modo electrospray. Las muestras (4-8 mg) fueron disueltas en 200 μ l de MeOH y luego diluídas por un factor de 10 en MeOH - H₂O. Alícuotas de 10 μ l fueron introducidas por inyección en una corriente de acetonitrilo:agua (5 μ l/min) a través de la probe del electrospray en la fuente de ionización a presión atmosférica. El cuadrupolo fue barrido desde 250 a 1400 Da en 10 segundos, trabajando en modo de iones negativos y los datos fueron adquiridos en el modo de análisis multicanal (MCA). El espectrómetro se calibró por introducción previa de una mezcla de PEG (polietilenglicol) e ionización en modo positivo.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) fueron realizados a 100,1 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15 y a 200,1 MHz en un espectrómetro Bruker ACE-200. Los espectros de RMN-¹H de las asterosaponinas de *Cosmasterias lurida* fueron realizados en un espectrómetro Bruker AMX 500 a 500 MHz.

Los espectros de RMN-¹³C fueron realizados a 50,3 MHz en un espectrómetro Bruker ACE-200. Los espectros de RMN-¹³C totalmente desacoplados de hidrógeno fueron obtenidos por irradiación a la frecuencia central de 4 ppm del espectro de RMN-¹H.

Los desplazamientos químicos para RMN-¹H se expresan en todos los casos en la escala δ , en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm) o el pico central del metanol a δ 3,30 ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las señales se indican en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), doble doblete (dd), multiplete (m) o singulete ancho (sa). Los desplazamientos químicos para RMN-¹³C se expresan en ppm utilizando como referencia el pico central de la señal correspondiente al cloroformo-d₁ (77,0 ppm), al metanol-d₄ (49,0 ppm) o la piridina-d₅ (135,9 ppm).

El espectro infrarrojo del alqueno sulfatado se realizó en un espectrofotómetro Nicolet Magna-550 FT-IR. Se homogeneizó la muestra con BrK seco y se preparó una pastilla.

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación. La evaporación de los mismos fue efectuada a temperaturas menores de 40 °C y presión reducida en evaporador rotatorio Büchi y Speedvac SC210A. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

METODOS CROMATOGRAFICOS

a) Cromatografía en capa delgada:

Se utilizaron las siguientes cromatoplasas:

- silicagel 60 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck o Riedel de Haën), espesor: 0,2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F₂₅₄).
- silicagel 60 preparadas sobre hojas de poliéster (Aldrich o Sigma), espesor: 0,2 mm, con indicador F₂₅₄.
- silicagel 60 de alta resolución (HPTLC- Merck), con indicador F₂₅₄.
- sílica gel de fase reversa C₁₈ de alta resolución (HPTLC- Merck), con indicador F₂₅₄.

Como agente de revelado se utilizó H₂SO₄-H₂O (1:1) y posterior calentamiento en estufa a 110 °C.

b) Cromatografía en capa preparativa:

Para muestras de menos de 40 mg, se emplearon en forma preparativa cromatoplasas de sílica gel 60 (Merck o Sigma) sobre vidrio, de 20 x 20 cm de superficie y 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a la longitud de onda de 254 nm (F₂₅₄).

En caso de mayor cantidad de muestra se prepararon placas de silicagel 60 G (Merck) de 2 mm de espesor sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm de superficie.

c) Cromatografía "flash" en columna seca:

Este método fue empleado para un fraccionamiento rápido del extracto y para separaciones cromatográficas en las cuales los componentes a separar presentaban diferencias de R_f no menores de 0,2. Se empleó silicagel 60 G (Merck) o Kieselgel S (Riedel de Haën).

d) Cromatografía en columna:

Se utilizaron como adsorbentes silicagel H (Merck), silicagel 60 (Merck, 230-400 mesh) y Kieselgel S (Riedel de Haën, 230-400 mesh) para cromatografía "flash". En todos los casos las cromatografías fueron realizadas con presión utilizando aire comprimido.

En las separaciones por geles se utilizó Sephadex LH-20 (Sigma) en MeOH y Sephadex LH-60 (Sigma) en MeOH:H₂O (2:1).

También se utilizó una columna de Amberlite XAD-2 (Sigma) eluyendo con agua hasta ausencia de cloruros y luego con MeOH.

e) Cromatografía de fase reversa:

Se realizó en embudos de vidrio sinterizado de diferentes tamaños con aplicación de vacío. Se utilizó sílica de fase reversa (Davisil C₁₈, 35-75 μ) y como solvente de desarrollo primero H₂O, luego mezclas H₂O - MeOH con cantidades crecientes de MeOH y finalmente MeOH.

f) Cromatografía líquida de alta resolución:

Las cromatografías líquidas de alta resolución fueron realizadas en dos cromatógrafos Micromeritics equipados uno con un detector de índice de refracción Micromeritics modelo 771 y otro con un detector de UV Micromeritics modelo 787, ambos con un inyector manual Micromeritics 730 y en un cromatógrafo Spectra Physics equipado con una bomba Spectra Series P100 y un detector de índice de refracción Shodex RI-71. Las columnas cromatográficas utilizadas en los distintos casos fueron las siguientes:

- 1) **μ -Bondapack C-18** (tamaño de partícula 10 μm , longitud 30 cm x 7,8 mm d.i.)
- 2) **Bondclone C-18** (tamaño de partícula 10 μm , longitud 30 cm x 7,8 mm d.i.)
- 3) **YMC-Pack ODS-A Rp-18** (tamaño de partícula 5 μm , longitud 25 cm x 20 mm d.i.)

Las mezclas de solventes utilizadas se indican en cada caso, y están expresadas en relaciones de volumen. Los solventes de elución utilizados fueron purificados por destilación.

HIDRÓLISIS Y ANÁLISIS DE LOS AZÚCARES DE LOS LURIDÓSIDOS A Y B -
PREPARACIÓN DE ALDONONITRILOS ACETILADOS.

Una solución de 4-6 mg del glicósido en H_2SO_4 2N se calienta a 100 °C en un vial durante 2 hs. La mezcla resultante se extrae con CH_2Cl_2 . La fase acuosa del hidrolizado se neutraliza con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y se centrifuga. El sobrenadante se evapora a sequedad a presión reducida. El producto seco se disuelve en

piridina (0,5 ml) y se trata con hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 60% en peso del azúcar). Se calienta en estufa a 65 °C durante 30 min. Se agrega Ac_2O (0,5 ml) y se calienta 20 minutos más. Se enfría y se extrae con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ (1:2) (3 ml). La fase orgánica se lava con agua (3 x 2 ml), s. s. de NaHCO_3 (2 x 2 ml) y nuevamente H_2O (2 x 2 ml) y se seca con MgSO_4 . Se evapora a sequedad. El análisis por CGL de los aldononitrilos acetilados obtenidos fue efectuada en una columna capilar SP-2330, t_i 200 °C (9 min) t_f 250 °C; 10 °C/min. (t_r = 3.59 min, xilosa).

METANÓLISIS DE LOS GLICÓSIDOS Y ANÁLISIS DE LOS AZÚCARES DE ASTEROSAPONINAS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Se disuelve 0,5 -1 mg de saponina en HCl 2N anhidro en metanol. Esta solución se calienta a 80°C en un vial durante 8 hs. Se enfría y la mezcla de reacción se neutraliza con Ag_2CO_3 , se centrifuga y el sobrenadante se evapora a sequedad bajo N_2 . El residuo se disuelve en TRISIL Z (5 μl) (N-trimetilsililimidazol en piridina) (Pierce Chemical Co) y se deja a temperatura ambiente durante 15 min. Los azúcares sililados se analizan por CGL con una columna capilar OV-101 a 158°C. La identificación se realiza por comparación con patrones de quinovosa, fucosa y xilosa metilados y sililados.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL OPHIDIANÓSIDO F Y EL COSMASTERÓSIDO B.

Se incuban 5,0 mg de saponina en 1 ml de buffer citrato (pH 4,5) con 6 mg de la mezcla de glicosidasas *Charonia lampas* (Shikagaku Kogyo) a 37°C. Luego de 36 hs de reacción se observa por ccd en sílica de fase normal ($n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (4:5:1) (fase superior)) la desaparición del producto de partida. La mezcla de

reacción se purifica a través de un cartucho Sep-pak C₁₈ lavando con agua y eluyendo el producto con MeOH. La purificación final se logra por CLAR (C₁₈ Bondclone (30 cm x 7,8 cm)) usando una mezcla de MeOH-H₂O (50:50) como eluyente. Se obtuvo el Cosmasterósido C {4} (2 mg) a partir del Ophidianósido F y el triglicósido {2a} (1,8 mg) a partir del Cosmasterósido B.

HIDRÓLISIS DEL COSMASTERÓSIDO A

Se utilizó ácido trifluoroacético dado que los rendimientos son en todos los casos al menos iguales a los obtenidos con ácidos minerales y el ácido trifluoroacético puede ser removido por evaporación.

Albersheim y col¹⁵⁸ estudiaron la influencia del tiempo de hidrólisis en la determinación de azúcares. En ese trabajo se reporta que trabajando con trifluoroacético 2N a 121 °C en una hora la hidrólisis se completa. Tiempos de reacción más largos provocan degradación de los productos de hidrólisis en algunos casos (xilosa).

Una solución de 15 mg del Cosmasterósido A en 1 ml de ácido trifluoroacético 2N se coloca en un vial y se calienta en estufa a 121°C durante una hora. Se enfría, se lleva a sequedad a presión reducida y el residuo se particiona entre agua (1 ml) y CH₂Cl₂. La fase acuosa se lava con CH₂Cl₂ (2 x 0,5 ml) y se lleva a sequedad a presión reducida.

PREPARACIÓN DE 1-DESOXI-1-(2-HIDROXIPROPILAMINO)ALDITOLES

A la mezcla de monosacáridos libres (1-5 mg) provenientes de la hidrólisis del Cosmasterósido A se le agregan las siguientes soluciones: a - solución 1:8 (S)-1-amino-2-propanol en metanol (20 µ de solución / mg de

azúcar); **b** - solución 1:4 de AcOH glacial en MeOH (17 μ l de solución / mg de azúcar); **c** - solución de NaBH₃CN al 3% en metanol (13 μ l solución / mg de azúcar). El vial bien cerrado se calienta durante 1-2 hs a 65 °C, se enfría y se agrega CF₃CO₂H 3M gota a gota (bajo campana, se liberan muy pequeñas cantidades de HCN) hasta pH 1-2. La mezcla de reacción se evapora a presión reducida (Speedvac), y luego se coevapora con agua (3 x 0,5 ml) y MeOH (3 x 0,5 ml). El residuo es luego tratado con piridina-Ac₂O durante 0,75 h a 100 °C. Se enfría y se extraen los derivados acetilados con CH₂Cl₂. Se lava la fase clorometilénica con agua (3 x 1 ml), solución saturada de NaHCO₃ (3 x 1 ml) y nuevamente agua (1 x 1 ml). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se inyecta en el cromatógrafo gaseoso.

Las cromatografías gaseosas se realizaron en un equipo Hewlett-Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama con una relación de Split de 100:1. Se utilizó una columna Ultra-2 (50 m x 0,2 mm), N₂ como gas carrier y una presión en la cabeza de la columna de 20 psi. El programa utilizado fue: 180°C, 4°C/min hasta 220°C (2 minutos), y luego 1°C/min hasta 250°C (10 min). Los patrones de 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino) alditoles de D-quinovosa, D-xilosa, D-glucosa y L-fucosa fueron preparados siguiendo la metodología descrita anteriormente a partir de 1-5 mg de los monosacáridos comerciales.

REACCIÓN GENERAL DE SOLVÓLISIS DE COMPUESTOS SULFATADOS

Una solución de 2-6 mg del esteroide sulfatado disuelto en dioxano (0,35 ml) y piridina (0,55 ml) se calienta 2 hs a 120 °C en un vial de buen cierre (Pierce de 1 ml). Se enfría, se agrega H₂O (1 ml) y se extrae con n-BuOH (3 x

0,5 ml). Los extractos butanólicos se juntan, se lavan con agua y se evaporan a sequedad a presión reducida.

PREPARACIÓN DE DERIVADOS ACETILADOS

Se trata la muestra (8 -10 mg) con una mezcla de anhídrido acético (1 ml) y piridina (1 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se agrega 1 ml de agua y se extrae con CH_2Cl_2 . Se evapora el solvente al vacío y el residuo se purifica por elución a través de un cartucho de sílica de fase reversa lavando primero con agua y eluyendo el producto acetilado con MeOH.

PREPARACIÓN DE LOS ESTERES DE MTPA DE ESTEROIDES

POLIHIDROXILADOS O SULFATADOS

Se trata el esteroide (1,5 mg) con el cloruro del ácido (+)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenil acético comercial (10 μl) disuelto en piridina seca (0,3 ml) durante 1 h a temperatura ambiente. Se evapora el solvente y el residuo se purifica a través de un cartucho Sep-pak C_{18} (MeOH:H₂O 50:50, MeOH) para dar el éster 3 β ,26-di-(+)-MTPA.

Los esteres 3 β ,26-di-(-)-MTPA se preparan con el cloruro de (-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenil acético.

DATOS ESPECTROSCÓPICOS Y CONSTANTES FÍSICAS DE LOS
COMPUESTOS AISLADOS

Glicósido	Rotación específica* [α] _D
Ophidianósido F {3}	+0,4 (MeOH)
Cosmasterósido A {1}	+5,3 (MeOH)
Cosmasterósido B {2}	+2,8 (MeOH)
Cosmasterósido C {4}	-7,0 (MeOH)
Cosmasterósido D {5}	+3,2 (H ₂ O)
Forbésido H {6}	-4,7 (H ₂ O)

* concentraciones en el rango 0,17 a 0,69 g/100ml.

Cosmasterósido A {1}: RMN ¹H en tabla 2; RMN ¹³C en tablas 3 y 4.

Cosmasterósido B {2}: RMN ¹H en tabla 2; RMN ¹³C en tablas 3 y 4.

Ophidianósido F {3}: fab de iones positivos m/z 1259 [MNa + Na]; RMN ¹H (CD₃OD) δ (aglicona) 0,93 (3H, d, J = 6,6 Hz, H₃-26), 0,94 (3H, d, J = 6,5 Hz, H₃-27), 1,37 (3H, s, H₃-21), 1,02 (3H, s, H₃-19), 0,81 (3H, s, H₃-18), 4,21 (1H, m, H-3), 2,42 (2H, d, J = 6,5, H-24), 2,62 (2H, cAB, J = 15,0 H-22), 5,37 (1H, da, J = 5,5 Hz, H-11). δ (azúcares) 1,29 (d, 3H, J = 5,8 Hz, Me-5' de quinovosa I), 1,32 (d, 3H, J = 6,2 Hz, Me-5' de fucosa), 1,39 (d, 3H, J = 6,3 Hz, Me-5' de quinovosa II), 3,95 (dd, 1H, J = 11,1; 4,5 Hz, H-5' ec de xilosa II), 4,13 (dd, 1H, J = 11,5; 4,6 Hz, H-5 ec de xilosa I), 4,43 (2H, J = 6,3 Hz) hidrógenos anoméricos de xilosas I y II, y 4,57 (d, 3H, J=7,1 Hz) hidrógenos anoméricos de quinovosas I, II y fucosa. RMN ¹³C (piridina-d₅) en tablas 3 y 4.

Cosmasterósido C {4}: RMN ^1H en tabla 2; RMN ^{13}C en tablas 3 y 4.

Cosmasterósido D {5}: RMN ^1H en tabla 2.

Forbésido H: {6}: fab de iones negativos m/z 957 $[\text{M}]^-$; RMN ^1H (CD_3OD) δ (aglicona) 0,95 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H_3 -26), 0,96 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H_3 -27), 1,37 (3H, s, H_3 -21), 1,02 (3H, s, H_3 -19), 0,81 (3H, s, H_3 -18), 4,22 (1H, m, H-3), 2,41 (2H, d, $J = 6,5$; H-24), 2,61 (c, $J = 15,0$; H-22), 5,37 (1H, da, $J = 5,5$ Hz). δ (azúcares) 1,29 (d, 3H, $J = 5,8$ Hz, Me-5' de quinovosa I), 1,39 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz, Me-5' de quinovosa II), 3,91 (dd, 1H, $J = 11,1$; 4,5 Hz, H-5' ec de xilosa), 4,42 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz) hidrógeno anomérico de la xilosa y 4,54 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz) hidrógeno anomérico de quinovosa I y 4,56 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz) hidrógeno anomérico de quinovosa II; RMN ^{13}C en tablas 3 y 4.

Luridósido A {7}: $[\alpha]_D + 3,7^\circ$ ($c = 0,4$, MeOH); fab de iones positivos m/z 725 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 709 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 607 $[\text{M} + \text{H} - \text{SO}_3]^+$; RMN ^1H (CD_3OD) δ (aglicona) 0,91 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H_3 - 26 o H_3 - 27) 0,92 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H_3 - 26 o H_3 - 27), 0,97 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H_3 - 21), 1,00 (3H, s, H_3 - 19), 1,28 (3H, s, H_3 - 18), 2,40 (1H, dd, $J = 12,0$, 3,5 Hz, H - 7ec), 2,40 (1H, m, H - 16ec), 3,54 (1H, m, H - 3 α), 3,73 (1H, ddd, $J = 10,5$; 10,5; 4,0, H - 6 β), 4,45 (1H, m, H - 15 α); δ (azúcar) (1H, debajo de la señal del solvente, H - 2'), 3,30 (1H, debajo de la señal del solvente, H - 5' ax), 3,50 (1H, t, $J = 9$ Hz, H - 3'), 4,15 (1H, dd, $J = 12,0$; 5,5 Hz, H - 5' ec), 4,19 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H - 1'); RMN ^{13}C en tabla 5.

Luridósido B {8}: $[\alpha]_D + 1,5^\circ$ ($c = 0,3$, MeOH); fab de iones positivos m/z 723 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 707 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 605 $[\text{M} + \text{H} - \text{SO}_3]^+$; RMN ^1H (CD_3OD) δ (aglicona) 0,87 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H_3 - 26), 0,94 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H_3 - 27), 1,02 (3H, d,

J=6,5 Hz, H₃-21), 1,00 (3H, s, H₃-19), 1,29 (3H, s, H₃-18), 2,40 (1H, dd, J = 12,0; 3,5 Hz, H-7ec), 2,40 (1H, m, H-16ec), 3,54 (1H, m, H-3 α), 3,73 (2H, m, H-6 β e H-24), 4,41 (1H, m, H-15 α), 5,35 (2H, m, H-22 e H-23); δ (azúcar) 3,26 (1H, debajo de la señal del solvente, H-2'), 3,30 (1H, debajo de la señal del solvente, H-5' ax), 3,50 (1H, t, J = 9 Hz, H-3'), 4,14 (1H, dd, J = 12,0; 5,5 Hz, H-5'ec), 4,19 (1H, m, H-4'), 4,26 (1H, d, J=7,5 Hz, H-1'); RMN ¹³C en tabla 5.

Pycnopodiósido C {9}: fab de iones negativos m/z 693 [M - H]⁻; RMN ¹H (CD₃OD) δ (aglicona) 0,96 (3H, d, J = 7,0 Hz, H₃-26), 0,96 (3H, d, J = 7,0 Hz, H₃-27), 0,96 (3H, d, J = 7,0 Hz, H₃-21), 1,01 (3H, s, H₃-19), 1,29 (3H, s, H₃-18), 2,40 (1H, dd, J = 12,0; 3,5 Hz, H-7ec), 2,40 (1H, m, H-16ec), 3,55 (1H, m, H-3 α), 3,71 (2H, m, H-6 β e H-24), 4,44 (1H, ta, J = 5,5; H-15 α), 5,35 (2H, m, H-22 e H-23); δ (azúcar) 3,21 (1H, dd, J = 7,5; 9,5 Hz, H-2'), 3,5 (1H, m, H-5'), 3,38 (1H, t, J = 9,5 Hz, H-3'), (debajo de la señal del solvente, H-4'), 4,32 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1'), 4,34 (1H, dd, J = 2,5; 11,5 Hz, H-6'), 4,18 (1H, dd, J = 5; 11,5 Hz, H-6').

RMN ¹³C (CD₃OD) Pycnopodiósido C {9}:

C1	39,5	C12	43,5	C23	28,9
C2	31,5	C13	44,4	C24	86,5
C3	72,3	C14	62,7	C25	32,4
C4	32,4	C15	71,3	C26	18,3
C5	54,0	C16	42,4	C27	18,5
C6	67,8	C17	58,2	C1'	104,3
C7	49,5	C18	16,6	C2'	75,7
C8	77,6	C19	14,1	C3'	78,0
C9	57,5	C20	36,2	C4'	71,4

C10	38,0	C21	19,0	C5'	76,0
C11	19,8	C22	32,9	C6'	68,5

(24S)-O-(β -D-xilopiranosil)-5 α -colest-3 β ,6 α ,8,15 β -pentol **{10}**: RMN ^1H (CD_3OD). Las señales correspondientes a la aglicona son idénticas a **{7}**; δ (azúcar) 3,18 (1H,t, J=10,0 Hz, H-5'ax.), 3,20 (1H,dd, J=7,5; 9,5 Hz, H-2'), 3,35 (1H, debajo de la señal del solvente, H-3'), 3,50 (1H, m, H-4'), 3,85 (1H, dd, J=10,0; 5,0 Hz, H-5'ec), 4,29 (1H, d, J = 7 Hz, H-1').

(24S)-O-(β -D-xilopiranosil)-5 α -colest-(22E)-eno-3 β ,6 α ,8,15 β -pentol **{11}**: RMN ^1H . Las señales correspondientes a la aglicona son idénticas a **{8}**; las señales del azúcar idénticas a **{10}**

Acanthaglicósido B **{12}**: fab de iones positivos m/z 1303 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 1287 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1281 $[\text{RSO}_3\text{K} + \text{H}]^+$, 1185 $[\text{M} - \text{SO}_3 + \text{H}]^+$, 771, 755 (pentasacárido), 625, 609, 593 (tetrasacárido), 479, 463, 447 (trisacárido); fab iones negativos m/z 1263 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1241 $[\text{M} - \text{Na}]^-$; RMN ^1H (CD_3OD) δ (aglicona) 1.33 (3H, s, H₃-21), 0.78 (3H, s, H₃-18), 1.90 (3H, sa, H₃-26), 2.11 (3H, sa, H₃-27), 0.98 (3H, s, H₃-19), 4.21 (1H, m, H -3), 5.37 (1H, da, J = 5.5 Hz, H -11), 6.2 (1H, s, H -24); δ (azúcares) en referencia 107. RMN ^{13}C en tabla 6.

Acanthaglicósido C **{13}**: fab de iones positivos m/z 1305 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 1289 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1283 $[\text{RSO}_3\text{K} + \text{H}]^+$, 1187 $[\text{M} - \text{SO}_3 + \text{H}]^+$, 771, 755 (pentasacárido), 625, 609, 593 (tetrasacárido), 479, 463, 447 (trisacárido); fab de iones negativos 1265 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1243 $[\text{M} - \text{Na}]^-$. RMN ^1H (CD_3OD) δ (aglicona) 1.33 (3H, s, H₃-21), 0.78 (3H, s, H₃-18), 0.88 (3H, d, J = 6.6, H₃-26), 0.90 (3H, d, J = 6.6, H₃-27), 0.98 (3H,

s, H₃-19), 4.21 (1H, m, H-3), 2.38 (2H, d, J = 6.5, H-24), 2.62 (2H, cAB, J = 15.0, H-22), 5.37 (1H, da, J = 5.5 Hz, H-11); δ (azúcares) en referencia 107.

RMN ¹³C (piridina-d₅) {12} y {13}:

	{12}	{13}		{12}	{13}		{12}	{13}
C1	35,9	35,8	C10	38,2	38,1	C19	19,2	19,1
C2	29,4	29,2	C11	116,6	116,5	C20	74,1	73,7
C3	78,0	78,0	C12	42,3	42,2	C21	27,3	26,9
C4	30,8	30,6	C13	41,5	41,5	C22	56,0	54,9
C5	49,2	49,1	C14	53,9	53,9	C23	201,8	211,8
C6	80,1	80,6	C15	23,3	23,1	C24	126,0	53,9
C7	41,5	41,5	C16	25,1	25,0	C25	155,0	24,2
C8	35,3	35,2	C17	59,6	59,7	C26	27,3	22,5
C9	145,0	145,4	C18	13,5	13,5	C27	20,6	22,4

RMN ¹³C de la porción glicosídica de {12} y {13} en tabla 6 (pág. 70)

5 α -colesta-3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β ,26-hexaol {14}: fab de iones negativos m/z 467 [M]⁻; RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,94 (3H, s, H₃-18); 0,94 (3H, d, J= 7 Hz, H₃-27); 0,98 (3H, d, J= 7 Hz, H₃-21); 1,21 (3H, s, H₃-19); 3,50 (1H, s a, H-6 α); 3,45 (1H, dd, J= 11; 5,5 Hz, H₂-26), 3,34 (1H, H₂-26, debajo de la señal del metanol), 4,04 (1H, m, H-3 α); 3,76 (1H, dd, J=10,5; 3,0; H-15 β); 4,00 (1H, dd, J= 7,5; 3,0; H-16 α); RMN ¹³C en tabla 7.

5 α -colesta-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-hexaol 15-sulfato {15}: fab de iones negativos m/z 531 [MSO₃]⁻. RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,76 (3H, s, H₃-18); 0,89 (3H, d, J= 7 Hz, H₃-27);

0,93 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H₃-21); 1,16 (3H, s, H₃-19); 3,47 (1H, s a, H-6 α); 3,40 (1H, dd, $J = 10,5; 5,0$; H₂-26), 3,28 (1H, dd, H₂-26, debajo de la señal del metanol), 4,0 (1H, m, H-3 α); 4,47 (1H, dt, $J = 9,0; 3,0$; H-15 β); RMN ¹³C en tabla 7.

5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 26-sulfato {16}: $[\alpha]_D + 64,0^\circ$ (c= 0,1, MeOH); *fab* iones negativos m/z 531 [MSO₃]⁻; RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,77 (3H, s, H₃-18); 0,94 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H₃-27); 0,99 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H₃-21); 1,20 (3H, s, H₃-19); 3,51 (1H, s a, H-6 α); 3,75-3,90 (3H, m, H₂-26 e H-15 β), 4,04 (1H, m, H-3 α); RMN ¹³C en tabla 7.

5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol {17}: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,76 (3H, s, H₃-18); 0,94 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H₃-27); 0,99 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H₃-21); 1,20 (3H, s, H₃-19); 3,51 (1H, s. a., H-6 α); 3,34 (1H, H-26, debajo de la señal del solvente); 3,45 (1H, dd, $J = 10,5; 5,0$ Hz, H-26); 3,90 (1H, dt, $J = 3,0; 9,0$ Hz, H-15 β); 4,04 (1H, m, H-3 α).

3 β ,26-di-(+)-MTPA de {17}: RMN ¹H (CD₃OD) δ 0,80 (3H, s, H₃-18); 0,97 (6H, d, $J = 6,7$ Hz, H₃-21 y H₃-27); 1,23 (3H, s, H₃-19); 3,50 (1H, s a, H-6 α); 4,15 (1H, dd, $J = 10,0; 5,5$ Hz) y 4,24 (1H, dd, $J = 10,0; 5,5$ Hz, H₂-26); 3,90 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz, H-15 β); 5,50 (1H, m, H-3 α).

3 β ,26-di-(-)-MTPA de {17}: El espectro RMN (CD₃OD) resulta idéntico a los valores del ester (+)-MTPA excepto las señales de H₂-26 a δ 4,13 (1H, dd, $J = 10,0; 5,5$ Hz) y 4,26 (1H, dd, $J = 10,0; 5,5$ Hz).

5 β -Colest-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol 3,21-disulfato {41}: *fab* de iones negativos m/z 617 [M(SO₃Na)(SO₃)⁻], 513 [617-SO₃Na-H], 497 [617-NaHSO₄]; RMN ¹H (CD₃OD)

δ 0,87 (6H, d, $J = 7,1$ Hz, H-26, H-27), 0,91 (3H, s, H-18), 1,13 (3H, s, H-19), 3,95 (1H, dd, $J = 9,2; 6,2$ Hz, H-21), 4,19 (4H, m, H-3 β , H-4 β , H-11 α , H-21).

5 β -Colesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol-24(28)-ene 3,21-disulfato {**42**} : fab de iones negativos m/z 629 [$M(SO_3Na)(SO_3^-)$], 527 [629- SO_3Na-H], 509 [629- $NaHSO_4$]; RMN 1H (CD_3OD) δ 0,93 (3H, s, H-18), 1,03 (6H, d, $J = 7,0$ Hz, H-26, H-27), 1,15 (3H, s, H-19), 3,95 (1H, dd, $J = 9,2; 6,2$ Hz, H-21), 4,19 (4H, m, H-3 β , H-4 β , H-11 α , H-21), 4,70 (2H, s.a., H-25, H-28).

5 β -Colesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol-(22 E)-22-eno 3,21-disulfato {**43**} : fab de iones negativos m/z 615 [$M(SO_3Na)(SO_3^-)$], 511 [615- SO_3Na-H], 495 [615- $NaHSO_4$]; RMN 1H (CD_3OD) δ 0,87 (6H, d, $J = 7,1$ Hz, H-26, H-27), 0,93 (3H, s, H-18), 1,14 (3H, s, H-19), 3,95 (1H, dd, $J = 9,2; 6,2$ Hz, H-21), 4,15 (4H, m, H-3 β , H-4 β , H-11 α , H-21), 5,25 (1H, dd, $J = 15,0; 8,0$; H-22), 5,41 (1H, m, H-23).

5 β -24-norcolesta-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetrol-(22 E)-22-eno 3,21-disulfato {**44**} : $[\alpha]_D + 10,9^\circ$ [c 0,62, MeOH]; fab de iones negativos m/z 601 [$M(SO_3Na)(SO_3^-)$] y picos intensos a m/z 497 y 479 correspondientes a los fragmentos obtenidos por las pérdidas de $NaSO_3$ con transferencia de protón [601 - $NaSO_3 - H$] y $NaHSO_4$ [601 - $NaHSO_4$]; RMN- 1H (CD_3OD) δ 0,93 (3H, s, Me-18), 0,96 (6H, d, $J = 6,6$ Hz, Me-26 y Me-27), 1,15 (3H, s, Me-19), 3,90 (1H, dd, $J = 9,2; 6,2$ Hz, H-21), 4,17 (4H, m, H-3 β , H-4 β , H-11 α , H-21), 5,25 (1H, dd, $J = 15,1; 7,8$ Hz, H-22), 5,43 (1H, dd, $J = 15,1; 6,2$ Hz, H-23).

RMN ^{13}C - de los compuestos {41} - {44} ^a

Carbono	{41}	{42}	{43}	{44}
1	36,1	36,1	36,1	36,1
2	23,5	23,5	23,5	23,4
3	82,4	82,5	82,4	82,5
4	75,2	75,3	75,2	75,3
5	48,8	48,8	48,8	48,8
6	27,0	27,0	27,0	27,1
7	28,6	28,6	29,0	28,8
8	31,8	31,6	31,8	31,6
9	45,8	45,8	45,8	45,8
10	36,4	36,4	36,3	36,4
11	68,9	68,9	68,8	68,8
12	49,6	49,8	49,6	49,6
13	42,7	42,7	42,6	42,6
14	59,4	59,3	59,5	59,5
15	25,1	25,2	25,1	25,1
16	29,9	29,7	29,9	29,9
17	52,6	52,5	52,7	52,7
18	15,1	15,1	15,3	15,4
19	27,4	27,4	27,4	27,4
20	41,6	41,4	46,7	46,6
21	69,5	69,4	71,6	71,5
22	30,9	31,8	131,0	129,8
23	24,5	29,9	134,0	139,3
24	40,7	157,9	43,2	
25	29,1	34,8	29,7	30,7
26	23,2	22,5	22,8	23,2
27	23,0	22,4	22,8	23,0
28		106,9		

^a Los espectros fueron realizados en CD_3OD .

colest-5-eno-2 β ,3 α ,21-triol 2,21-disulfato **{56}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 4,42 (1H, d. a., 2,5 Hz, H-2), 4,02 (1H, d. a., 2,5 Hz, H-3), 2,81 (1H, dd, 14,6; 2,7 Hz, H-4ax.), 5,34 (1H, m, H-6), 1,06 (1H, m, H-7ec.), 1,57 (1H, m, H-7ax.), 0,73 (3H, s, H-18), 1,16 (3H, s, H-19), 3,97 (1H, dd, J = 9,8; 6,4 Hz, H-21), 4,18 (1H, dd, J = 9,8; 3,7 Hz, H-21), 0,88 (3H, d, J = 6,5, H-26), 0,88 (3H, d, J = 6,5, H-27).

colesta-5,24-dieno-2 β ,3 α ,21-triol 2,21-disulfato **{57}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 4,42 (1H, d. a., 2,5 Hz, H-2), 4,03 (1H, d. a., 2,5 Hz, H-3), 2,81 (1H, da, 14,7 Hz, H-4ax.), 5,34 (1H, m, H-6), 0,72 (3H, s, H-18), 1,15 (3H, s, H-19), 3,97 (1H, dd, J = 9,5; 6,2 Hz, H-21), 4,18 (1H, dd, J = 9,5; 3,7 Hz, H-21), 5,12 (t, 6,7 Hz, H-24), 1,60 (3H, s, H-26), 1,65 (3H, s, H-27).

colest-24-eno-2 β ,3 α ,21-triol 3,21-disulfato **{58}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 4,06 (1H, s. a., H-2), 4,39 (1H, s. a., H-3), 0,70 (3H, s, H-18), 0,99 (3H, s, H-19), 3,94 (1H, dd, J = 9,5; 6,2 Hz, H-21), 4,17 (1H, dd, J = 9,5; 3,7 Hz, H-21), 5,09 (t, 6,7 Hz, H-24), 1,61 (3H, s, H-26), 1,65 (3H, s, H-27).

colesta-5,24-dieno-2 α ,3 α ,4 β ,21-tetraol 3,21-disulfato **{59}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 3,88 (1H, m, H-2), 4,42 (1H, dd, 5,1; 2,2 Hz, H-3), 4,26 (1H, d, 2,2 Hz, H-4), 5,65 (1H, m, H-6), 0,75 (3H, s, H-18), 1,22 (3H, s, H-19), 3,97 (1H, dd, J = 10,0; 6,4 Hz, H-21), 4,18 (1H, dd, J = 10,0; 3,6 Hz, H-21), 5,10 (t, 6,7 Hz, H-24), 1,61 (3H, s, H-26), 1,65 (3H, s, H-27).

colest-5-eno-2 α ,3 α ,4 β ,21-tetraol 3,21-disulfato **{60}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 3,83 (1H, m, H-2), 4,42 (1H, dd, 5,1; 2,2 Hz, H-3), 4,26 (1H, d, 2,2 Hz, H-4), 5,60 (1H, m, H-6), 0,75 (3H, s, H-18), 1,26 (3H, s, H-19), 3,93 (1H, dd, J = 10,0; 6,3 Hz, H-

21), 4,18 (1H, dd, $J = 10,0; 3,5$ Hz, H-21), 0,88 (3H, d, 6,5 Hz, H-26), 0,88 (3H, d, 6,5 Hz, H-27).

colest-5,24-dieno-2 β ,3 α ,21-triol **{57a}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 3,66 (1H, s.a., H-2), 3,66 (1H, s. a., H-3), 2,93 (1H, da, 14,7 Hz, H-4ax.), 5,42 (1H, m, H-6), 0,68 (3H, s, H-18), 1,15 (3H, s, H-19), 3,66 (1H, m, H-21), 3,79 (1H, dd, $J = 9,5; 3,7$ Hz, H-21), 5,08 (t.a., 6,7 Hz, H-24), 1,59 (3H, s, H-26), 1,66 (3H, s, H-27).

colest-5,24-dieno-2 β ,3 α ,21-triol **{57a}**: RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,66 (1H, s.a., H-2), 3,66 (1H, s. a., H-3), 2,92 (1H, da, 14,7 Hz, H-4ax.), 5,42 (1H, m, H-6), 0,67 (3H, s, H-18), 1,14 (3H, s, H-19), 3,74 (1H, dd, $J = 10,8; 4,4$ Hz, H-21), 3,81 (1H, dd, $J = 10,8; 3,0$ Hz, H-21), 5,09 (t.a., $J = 6,7$ Hz, H-24), 1,58 (3H, s, H-26), 1,66 (3H, s, H-27).

colest-5,24-dieno-2 β ,3 α ,21-triol **{57a}**: RMN ^1H (Py-d_5) δ 4,49 (1H, s.a., H-2), 4,49 (1H, s. a., H-3), 3,45 (1H, da, 13,9 Hz, H-4ax.), 5,38 (1H, m, H-6), 0,83 (3H, s, H-18), 1,74 (3H, s, H-19), 3,93 (1H, d.a., $J = 10,4$ Hz, H-21), 4,11 (1H, d.a., $J = 10,4$ Hz, H-21), 5,10 (t.a., $J = 6,7$ Hz, H-24), 1,63 (3H, s, H-26), 1,69 (3H, s, H-27).

colest-5,24-dieno-2 β ,3 α ,21-triol 3-acetato,2,21-disulfato **{57b}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 4,48 (1H, s. a., H-2), 5,09 (1H, s. a., H-3), 2,80 (1H, da, 14,7 Hz, H-4ax.), 5,29 (1H, m, H-6), 0,73 (3H, s, H-18), 1,17 (3H, s, H-19), 3,96 (1H, dd, $J = 9,5; 6,2$ Hz, H-21), 4,17 (1H, dd, $J = 9,5; 3,7$ Hz, H-21), 5,09 (s.a., H-24), 1,61 (3H, s, H-26), 1,66 (3H, s, H-27), 2,06 (3H, s, OAc).

RMN ^{13}C de los compuestos **{56}**-**{60}** en tabla 14.

FAB $^+$ de los compuestos **{56}**-**{60}** en el texto (Cap. 3.2)

colest-5-eno-2 β ,3 α ,21-triol 3,21-disulfato **{61}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 1,85 (1H, dd, J = 13,2; 2,4 Hz, H-1), 1,56 (1H, dd, J = 13,2; 4,6 Hz, H-1), 4,06 (1H, da, 2,0 Hz, H-2), 4,41 (1H, m, H-3), 2,31 (1H, da, 15,0 Hz, H-4), 2,81 (1H, dt, J = 15,0; 2,0 Hz, H-4), 5,34 (1H, da, J = 5,5 Hz, H-6), 0,74 (3H, s, H-18), 1,15 (3H, s, H-19), 3,94 (1H, dd, J = 10,0; 6,5 Hz, H-21), 4,20 (1H, dd, J = 10,0; 3,8 Hz, H-21), 0,87 (6H, d, J = 7 Hz, H-26, H-27).

colest-5-eno-3 α ,4 β ,21-triol 3,21-disulfato **{62}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 4,48 (1H, c, J = 2,7 Hz, H-3), 4,16 (1H, da, 2,7 Hz, H-4), 5,61 (1H, da, J = 3,8 Hz, H-6), 0,74 (3H, s, H-18), 1,19 (3H, s, H-19), 3,94 (1H, dd, J = 10,0; 6,5 Hz, H-21), 4,20 (1H, dd, J = 10,0; 3,7 Hz, H-21), 0,87 (6H, d, J = 7 Hz, H-26, H-27).

RMN ^{13}C de los compuestos **{61}**, **{62}** y **{63}** en tabla 15.

5 β -colesta-3 α ,4 α ,11 β ,12 β ,21-pentol 3,21-disulfato **{64}**: RMN ^1H (CD_3OD) δ 0,88 (6H, d, J = 7,1 Hz, H-26, H-27), 0,86 (3H, s, H-18), 1,19 (3H, s, H-19), 4,03 (dd, J = 9, 5,5 Hz, H-21), 4,19 (3H, m, H-3 β , H-4 β , H-21), 3,24 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-12), 3,95 (1H, t, J = 3,5 Hz, H-11).

RMN ^{13}C del compuesto **{64}**

Carbono			
1	36,0	15	24,8
2	24,8	16	29,5
3	82,3	17	53,2
4	75,2	18	10,5
5	48,6	19	27,5

6	26,4	20	39,1
7	27,0	21	72,3
8	30,6	22	30,1
9	45,2	23	23,5
10	36,4	24	40,7
11	73,4	25	29,1
12	81,2	26	23,0
13	49,0	27	23,1
14	57,0		

Citas bibliográficas

1. M. P. Maillard and K. Hostettmann. Determination of saponins in crude plant extracts by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *J. of Chrom.* **647**, 137 (1993).
2. D. J. Burnell and J. W. ApSimon. Echinoderm Saponins. In: "Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives" (Scheuer, P. J., ed) Vol. V, p. 287, New York: Academic Press (1983).
3. M. Kobayashi, Y. Kiyota, O. Satomi, Y. Kyogoku and I. Kitagawa. Five new steroidal glycosides, Pregnedioside A, B and their three monoacetals, from an Okinawan soft coral of *Alcyonium sp.* *Tetrahedron Lett.* **25**, 3731 (1984).
4. M. M. Bandurraga and W. Fenical; Isolation of Muricins. Evidence of a Chemical adaptation against Fouling in the marine octocoral *Murina fruticosa* (Gorgonacea) *Tetrahedron* **41**, 1057 (1985).
5. N. Fusetani, K. Yasukawa, S. Matsunaya and K. Hashimoto. Dimorphosides A and B, Novel Steroid glycosides from the Gorgonian *Anthoplexaura dimorpha*. *Tetrahedron Lett.* **28**, 1187 (1987).
6. J. M. Wasylyk, G. E. Martin, A. J. Weinheimer and M. Alam. Isolation and structure identification of a new pregnane glycoside from the Gorgonian *Pseudoplexaura wayenaoni*. *J. Nat. Prod.* **52**, 391 (1989).
7. I. Kitagawa, M. Kobayashi, Y. Okamoto, M. Yoshikawa and Y. Hamamoto. Structures of Sarasinosides A1, B1 and C1; New Norlanostane triterpenoid oligoglycosides from the Paluan Marine sponge *Asteropus sarasinosum*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 5036 (1987).
8. F. J. Schmitz, M. B. Ksebati, S. P. Gunasekera and S. Agarwal. Sarasinoside A1: A saponin containing amino sugars isolated from a sponge. *J. Org. Chem.* **53**, 594 (1988).

9. S. Carmely, M. Roll, Y. Loya and Y. Kashman. The structure of Eryloside, a new antitumor and antifungal 4-methylated steroidal glycoside from the sponge *Erylus lendenfeldi*. *J. Nat. Prod.* **52**, 167 (1989).
10. H. Hirota, S. Takayama, S. Miyashiro, Y. Ozaki and S. Ikegami. Structures of a novel steroidal saponin, Pachastrelloside A, obtained from a marine sponge of the genus *Pachastrella*. *Tetrahedron Lett.* **31**, 3321 (1990).
11. M. V. D' Auria, L. Gomez Paloma, L. Minale, R. Riccio and C. Debitus. Structure characterization by two dimensional NMR spectroscopy of two marine triterpene oligoglycosides from a Pacific sponge of the genus *Erylus*. *Tetrahedron* **48**, 491 (1992).
12. K. Tachibana, M. Sakaitani and K. Nakanishi. Pavonins, shark repelling and ichthyotoxic steroid N-Acetylglucosaminides from the defense secretion of the Sole *Pardachirus Pavininus* (Soleidae). *Tetrahedron* **41**, 1027 (1985).
13. I. I. Maltsev, V. A. Stonik, A. I. Kalinovsky and G. B. Elyakov. Triterpene glycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **78B**, 2, 421 (1984).
14. L. H. Hyman, "The invertebrates" Vol. 4: "Echinodermata. The Coelomate Bilateria", p 700, McGraw-Hill, New York (1955).
15. H. B Fell and D. L. Pawson. In: "Physiology of Echinodermata" (R. A. Boolootian De.) Wiley (Interscience), New York, p 1-48 (1966).
16. R. Riccio, M. V. D' Auria and L. Minale. Two new steroidal glycoside sulfates, Longicaudoside-A and -B from the Mediterranean Ophiuroid *Ophioderma longicaudum*. *J. Org. Chem.* **51**, 533 (1986).
17. J. A. Rideout and M. D. Sutherland. Pigments of marine animals. XV. Bianthrone and related polyketides from *Lamprometra palmata gyges* and other species of crinoids. *Aust. J. Chem.* **38**, 793 (1985).

18. M. Blumer. Organic Pigments: Their long-term fate. Fossil pigments provide evidence of modification of chemical structure under geological conditions. *Science* **149**, 722 (1965).
19. B. Mulloy, A. C. Ribeiro, A. P. Alves, R. P. Vieira and P. A. S. Mourão. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. *J. Biol. Chem.* **269**, 22113 (1994).
20. J. A. Palermo. "Estudio químico de tres especies de algas rojas de la familia de las Corallinaceas". Tesis doctoral, Univ. de Buenos Aires, 1989.
21. M. S. Romero "Estudio de los esteroides presentes en los moluscos marinos *Chlamys tehuelchus*, *Aulacomya ater ater*, *Patinigera magellanica*, *Siphonaria lessoni*, *Fisurella maxima* y *Adelomedon ancilla*". Tesis doctoral, Univ. de Buenos Aires, 1986.
22. Y. Hashimoto. "Marine toxins and other bioactive marine metabolites", p. 268-288. Tokyo, Japan Scientific Societies Press (1979).
23. Y. Hashimoto and T. Yasumoto. Confirmation of saponin as a toxic principle of starfish. *Bull. Japn. Soc. Sci. Fish.* **26**, 1132 (1960).
24. T. Yasumoto, T. Wanatabe and Y. Hashimoto. Physiological activities of starfish saponin. *Bull. Japn. Soc. Sci. Fish.* **30**, 357 (1964).
25. R. J. Owellen, R. G. Owellen, M. A. Gorof and D. Klein. Cytolytic saponin fraction from *Asterias vulgaris*. *Toxicon* **11**, 319 (1973).
26. A. M. Mackie, R. Lasker and P. T. Grant. Avoidance reactions of mollusc *Buccinum undatum* to saponin-like surface-active substances in extracts of the starfish *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **36**, 415 (1968).
27. T. Yasumoto, M. Tanaka and Y. Hashimoto. *Nippon Suisan Gakkaishi* **32**, 673 (1966).

28. B. G. Burns, M. W. Gilgan, V. H. Logan, J. Burnell and J. W. ApSimon.
Estimation of a steroid released from the crude saponins of the starfish *Asterias vulgaris* by solvolysis: Seasonal and geographic abundance. *Anal. Biochem.* **81**,196 (1977).
29. S. Ikegami, Y. Kamiya and S. Tamura. Isolation and Characterization of
Spawning inhibitors in ovary of the starfish *Asterias amurensis*. *Agr. Biol. Chem.* **36**, 2005 (1972).
30. Y. Fujimjoto, T. Yamada, N. Ikekawa, Y. Nishiyama, T. Matsui and M. Hoshi.
Structure of acrosome reaction-inducing steroidal saponins from the egg jelly of
the starfish *Asterias amurensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1829 (1987).
31. R. F. Nigrelli, M. F. Stempien, Jr., G. D. Ruggeri, V. R. Liguori and J. T. Cecil.
Substances of potencial importance from marine organisms. *Fed. Proceed.* **26**,
1197 (1967).
32. G. D. Ruggeri and R. F. Nigrelli. "Physiologically active substances from
echinoderms. In: Bioactive compounds from the sea". Humm, H. J. and C. E.
Lane, ed(s), Marine Science Series, Vol. 1, p. 183, 1974.
33. G. R. Pettit, F. F. Day, J. L. Hartwell and H. B. Wood. Antineoplastic
components of marine animals. *Nature* **227**, 962 (1970).
34. Y. Shimizu. Antiviral substances in starfish. *Experientia* **27**, 1188 (1971).
35. L. A. Goldsmith and G. P. Carlson. "Pharmacological evolution of an
asterosaponin from *Asterias forbesi*". Food-drugs from the sea, Proc. (1974).
(Webber, H. and G. D. Ruggeri ed.s), p. 354. Washington, Marine Technol.
Soc. (1976).
36. G. D. Ruggeri and R. F. Nigrelli. Effects of extracts of the sea star *Acanthaster
planci* on the developping sea urchin. *Am. Soc. Biol.* **6**, 592 (1966).

37. N. Fusetani, Y. Kato, K. Hashimoto, T. Komori, Y. Itakura and T. Kawasaki.
Biological activities of asterosaponins with special reference to structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* **47**, 997 (1984).
38. L. Anderson, L. Bohlin, M. Iorizzi, R. Riccio, L. Minale and W. Moreno-Lopez.
Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle stars. *Toxicon* **27**, 179 (1989).
39. M. A. Dubois, R. Higuchi, T. Komori and T. Sasaki. Structures of two new oligoglycosides sulfates, Pectinosides E and F, and biological activities of the six new pectinosides. *Liebigs Ann. Chem.* 845 (1988).
40. R. Riccio, O. Squillace Greco, L. Minale, J. Pusset and J. L. Menou. Starfish saponins, Part 18. Steroidal glycoside sulfates from the starfish *Linckia laevigata*. *J. Nat. Prod.* **48**, 97 (1985).
41. M. V. D' Auria, A. Fontana, L. Minale and R. Riccio. Starfish saponins. Part XLII. Isolation of twelve steroidal glycosides from the Pacific Ocean starfish *Henricia laeviuscola*. *Gazz. Chim. It.* **120**, 155 (1990).
42. M. Iorizzi, L. Minale and R. Riccio. Starfish saponins. Part 39. Steroidal oligoglycoside sulphates and polyhydroxysteroids from the starfish *Asterina pectinifera*. *Gazz. Chim. It.* **120**, 147 (1990).
43. M. V. D' Auria, M. Iorizzi, L. Minale and R. Riccio. Starfish saponins. Part 40. Structures of two new "asterosaponins" from the starfish *Patinia miniata*. Patirioside A and Patirioside B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1019 (1990).
44. R. Riccio, M. Iorizzi and L. Minale. Starfish saponins XXX. Isolation of sixteen steroidal glycosides and three polyhydroxysteroids from the Mediterranean starfish *Coscinasterias tenuispina*. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **95**, 869 (1986).
45. M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio, T. Higa and J. Tanaka. Starfish saponins. Part.
46. Steroidal glycosides and polyhydroxysteroids from the starfish *Culcita novaeguineae*. *J. Nat. Prod.* **54**, 1254 (1991).

46. M. V. D' Auria, E. Finamore, L. Minale, C. Pizza, R. Riccio, F. Zollo, M. Pusset and P. Tirard. Steroids from the starfish *Euretaster insignis*: a novel group of sulphated 3β , 21-dihidroxysteroids. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans I* 2277 (1984).
47. Y. Kitagawa, K. Kobayashi and T. Sugawara. Saponin and sapogenol XXV. Steroidal saponins from the starfish *Acanthaster planci* L. (Crown of the Thorns). Structures of two fenuine sapogenols, Thornasterol A and Thornasterol B, and their sulfates. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 1852 (1978).
48. F. De Simone, A. Dini, L. Minale, C. Pizza and R. Riccio: Starfish saponins III. A novel steroidal sapogenin, 17β -methyl- 3β , 6α -dihidroxy-18-nor- 5α -cholesta-9(11), 13-dien-23-one from the Starfish *Astropecten aurantiacus*. *Tetrahedron Lett.* 959 (1979).
49. F. De Simone, A. Dini, E. Finamore, L. Minale, C. Pizza and R. Riccio. Starfish saponins IV. Sapogenins from the starfish *Astropecten aurantiacus* and *Marthasterias glacialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**, 25 (1979).
50. L. Kitagawa and M. Kobayashi. Saponin and sapogenol. XXVI. Steroidal saponins from the starfish *Acanthaster planci* L. (Crown of the Thorns). Structure of the major saponin Thornasteroside A. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1864 (1978).
51. S. Ikegami, K. Okano and H. Muragaki. Structure of glycoside B2. Asteroidal saponin in the ovary of the starfish *Asterias amurensis*. *Tetrahedron Lett.* 1769 (1979).
52. K. Okano, T. Nakamura, Y. Kamiya and S. Ikegami. Structure of Ovarian Asterosaponin-1 in the starfish *Asterias amurensis*. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 805 (1981).
53. F. De Simone, A. Dini, E. Finamore, L. Minale, C. Pizza, R. Riccio and F. Zollo. Structure os sepositoside A, a novel steroidal cyclic glycoside from the starfish *Echinaster sepositus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1855 (1981).

54. R. Riccio, F. de Simone, A. Dini, L. Minale, C. Pizza, F. Senatore and F. Zollo. Unique 22,23-epoxysteroidal cyclic glycosides minor constituents from *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1557 (1981).
55. R. Riccio, A. Dini, L. Minale, C. Pizza, F. Zollo and T. Sevenet. Structure of Luzonicoside, a further steroidal cyclic glycoside from the Pacific starfish *Echinaster luzonicus*. *Experientia* **38**, 68 (1982).
56. R. Riccio, M. V. D'Auria, M. Iorizzi, L. Minale, D. Laurent and D. Duhet. Starfish saponins. XXV. Steroidal glycosides from the starfish *Gamophia watsoni*. *Gazz. Chim. It.* **115**, 405 (1985).
57. R. Riccio, L. Minale, S. Bano, N. Bano and Uddin Ahmad. Starfish saponins. Part XXXIII. Two novel steroidal xylofuranosides from the starfish *Astropecten indicus*. *Gazz. Chim. It.* **117**, 755 (1987).
58. L. Anderson, S. Bano, L. Bohlin, R. Riccio and L. Minale. Studies of swedish marine organisms VII. A novel bioactive steroidal glycoside from the starfish *Crossaster papposus*. *J. Chem. Research* (S), 366 (1985), (M), 3873 (1985).
59. Y. Hirano, T. Eguchi, M. Ishiguro and N. Ikekawa. Configurationa at the C-23 position of 23-hydroxy- and 23,25-dihydroxycholesterols. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 394 (1983).
60. R. Riccio, M. V. D'Auria and L. Minale. Unusual sulfated marine steroids from the ophiuroid *Ophioderma longicaudum*. *Tetrahedron* **41**, 6041 (1985).
61. M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio and H. Kamiya. Starfish saponins 45. Novel sulfated steroidal glycosides from the starfish *Astropecten scoparius*. *J. Nat. Prod.* **53**, 1225 (1990).
62. E. Finamore, L. Minale, R. Riccio. G. Rinaldo and F. Zollo. Novel marine polyhydroxylated steroids from the starfish *Myxoderma platyacanthum*. *J. Org. Chem.* **56**, 1146 (1991).

63. L. Minale, R. Riccio, F. De Simone, A. Dini, C. Pizza and E. Ramundo. 3 β -hidroxy-5 α -cholesta-6,14-dien-23-one, The major genin from the starfish *Echinaster sepositus*. *Tetrahedron Lett.* **29**, 2609 (1978).
64. F. De Riccardis, M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio and C. Debitus. The first occurrence of polihidroxyated steroids with phosphate conjugation from the starfish *Tremaster novaecaledoniae*. *Tetrahedron Lett.* **33**, 1097 (1992).
65. L. N. Zibareva, U. A. Baltayev, T. P. Sviridova, T. P. Saatov, N. K. Abubakirov. Species of the genus *Lychnis* L. , a promising sources of ecdysteroids. *Rastit. Resur.* **31** (4), 1 (1995).
66. R. Higuchi, J. X. Jhou, Y. Kazuyoshi and T. Komori. Isolation and structure of six new cerebrosides, Asteriacerebrosides A-F and the known cerebrosides, Astrocerebroside A and Acanthacerebroside C. *Liebigs Ann. Chem.* 745 (1991).
67. W. Jin, K. L. Rinehart and E. A. Jares-Erijman. Ophidiacerebrosides. Citotoxic glycosphingolipids containing a novel sphingosine from a sea star. *J. Org. Chem.* **59**, 144 (1994).
68. R. Higuchi, S. Matsumoto, M. Fujita, T. Komori and T. Sasaki. Structure of two new ganglioside molecular species and biological activity of the ganglioside. *Liebigs Ann. Chem.* 545 (1995).
69. E. Palagiano, S. de Marino, L. Minale, R. Riccio, F. Zollo, M. Iorizzi, J. B. Carré, C. Debitus, L. Lucarain and J. Prevost. Ptilomycalin A, Crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffermani*. *Tetrahedron* **51**, 12, 3675 (1995).
70. A. Elgsaeter, J. D. Tauber and S. Liaaen-Jensen. Carotenoid distribution and carotenoprotein of *Asterias rubens*. *Biochim. Biophys. Acta* **530**, 402 (1978).
71. C. C. Shone, G. Britton and T. T. W. Goodwin. The violet carotenoprotein of the starfish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 507 (1979).

72. B. Czeczuga. Carotenoprotein complexes in four species of *Echinodermata* from the Adriatic. *Biochem. Sys. Ecol.* **11**, 123 (1983).
73. P. F. Zagalsky, F. Haxo, S. Hertzberg and S. Liaaem-Jensen. Studies on a blue carotenoprotein Linckiacyanin, isolated from the starfish *Linckia laevigata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**, 2, 339 (1989).
74. D. Bloch. "On the evolution of a biosynthetic pathway". In: "Reflections on Biochemistry". Cap 2, p. 143. De. A. Kornberg, B. L. Horecker, L. Cornudella y J. Oró. Pergamon Press, Oxford, New York (1976).
75. D. R. Idler, P. M. Wiseman, L. M. Safe. A new marine sterol, 22-*trans*-24-norcholesta-5,22-dien-3 β -ol. *Steroids* **16**, 451 (1970).
76. M. Kobayashi, R. Tsuru, K. Todo and H. Mitsuhashi. Asteroid sterols. *Tetrahedron Lett.* **29**, 2935 (1972).
77. Y. Rubinstein, Ph. D. Thesis, Univ. of Liverpool, Liverpool (1973).
78. M. Kobayashi and H. Mitsuhashi. Structure and synthesis of Amuresterol. A new marine sterol with unprecedented side chain from *Asterias amurensis* Lütken. *Tetrahedron* **30**, 2147 (1974).
79. K. C. Gupta. and P. J. Scheuer. Echinoderm sterols. *Tetrahedron* **24** 5831 (1968).
80. Scheuer, P. J.. "Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives". Volume V, 313 (1983).
81. H. J. N. Schoenmakers. In vitro biosynthesis of steroid from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 63**, 179 (1979).
82. L. J. Goad. Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure Appl. Chem* **51**, 837 (1981).
83. Y. M. Sheikh, B. M. Tursch and C. J. Djerassi, 5 α -pregn-9(11)-ene-3 β ,6 α -diol-20-one and 5 α -cholesta-9(11),20(22)-diene-3 β ,6 α -diol-23-one. Two novel

- steroids from the starfish *Acanthaster planci*. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3278 (1972).
84. P. A. Voogt and J. W. A. Van Rheenen. Composition and biosynthesis of sterols in some sponges. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 54**, 473 (1976).
85. G. B. Elyakov, T. A. Kuznetsova, V. A. Stonik and V. V. Mikhailov. New Trends of marine biotechnology development. *Pure and Appl. Chem.* **66**, 4, 811 (1994).
86. I. Bruno, M. V. D'Auria, M. Iorizzi, L. Minale and R. Riccio. Marine eicosanoids: Occurrence of 8,11,12-trihydroxylated eicosanoic acids in starfishes. *Experientia* **48**, 1, 114 (1992).
87. A. M. Seldes and E. Gros. Main sterols from the starfish *Cosmasterias lurida*. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 2, 337 (1985).
88. R. Riccio, C. Pizza, O. Squillace-Greco and Luigi Minale. Steroidal glycoside sulphates from the starfish *Ophidiaster ophidianus* and *Hacelia attenuata*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 655 (1985).
89. R. Riccio, O. Squillace-Greco, L. Minale, S La Barre and D. Laurent. Steroidal oligoglycosides from the pacific starfish *Thromidia catalai*. *J. Nat. Prod.* **51**, 5, 1003 (1988).
90. J. A. Findlay, Z. Q. He and B. Blackwell. Minor saponins from the starfish *Asterias forbesi*. *Can. J. Chem.* **68**, 7, 1215 (1990).
91. I. Bruno, L. Minale, C. Pizza, F. Zollo, R. Riccio and F. M. Mellon. Structures of the steroidal glycoside sulphates from the starfish *Marthasterias glacialis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1875 (1984).
92. R. Riccio, M. Iorizzi, L. Minale, Y. Oshima and T. Yasumoto. Novel steroidal glycoside sulphates from the starfish *Asterias amurensis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1337 (1988).
93. Y. Itakura, T. Komori and T. Kawasaki. Steroid oligoglycosides from the starfish *Astropecten latespinosus* Meissner. *Liebig Ann. Chem.* 56 (1983).

94. H. C. Krebs, T. Komori and T. Kawasaki. Steroid oligoglycoside from the starfish *Luidia maculata*. *Liebigs Ann. Chem.* 296 (1984).
95. P. A. J. Gorin and M. Mazurek. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Can. J. Chem.* **53**, 1212 (1975).
96. M. J. Vázquez, E. Quiñoá, R. Riguera, A. San Martín and J. Dárias. Santiagoside, the first asterosaponin from an antartic starfish (*Neosmilaster georgianus*). *Tetrahedron* **48**, 32, 6739 (1992).
97. I. Bruno, L. Minale and R. Riccio. Steroidal glycosides from the starfish *Pycnopodia helianthoides*. *J. Nat. Prod.* **52**, 5, 1026 (1989).
98. L. Minale, C. Pizza, R. Riccio and F. Zollo. Further 24-O-glycosidated steroids from the starfish *Hacelia attenuata*. *Experientia* **39**, 569 (1983).
99. M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio, M. Debray and J. Menou. Steroidal glycosides from the starfish *Halityle regularis*. *J. Nat. Prod.* **49**, 67 (1986).
100. L. Anderson, A. Nasir, L. Bohlin and L. Kenne. Studies of swedish marine organisms. Polyhydroxylated steroidal glycosides from the starfish *Porania pulvillus*. *J. Nat. Prod.* **50**, 5, 944 (1987).
101. F. Zollo, E. Finamore and L. Minale. Novel polyhydroxysteroids and steroidal glycosides from the starfish *Sphaerodiscus placenta*. *J. Nat. Prod.* **50**, 5, 794 (1987).
102. F. Zollo, E. Finamore, C. Martuccio and L. Minale. Steroidal glycosides from the starfish *Pisaster giganteus*. *J. Nat. Prod.* **53**, 4, 1000 (1990).
103. A. S. Shashkov, G. M. Lipkind, Y. A. Knirel and N. K. Kochetkov. Stereochemical factors determining the effects of glycosylation on the ^{13}C chemical shifts in carbohydrates. *Magn. Reson. Chem.* **26**, 735 (1988).
104. S. Seo, Y. Tomita, K. Tori and Y. Yoshimura. Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using

- glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3331 (1978).
105. J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher. α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *J. Org. Chem.* **34**, 2543 (1969).
106. R. Riccio, M. Iorizzi, L. Minale, Y. Oshima and T. Yasumoto. Novel steroidal glycoside sulphates from the starfish *Asteris amurensis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1337 (1988).
107. Y. Itakura, and T. Komori. Steroid oligoglycosides from the starfish *Acanthaster planci* L. Structures of four new oligoglycoside sulfates. *Liebigs Ann. Chem.* 499 (1986).
108. M. A. Dubois, Y. Noguchi, R. Higuchi and T. Komori. Structures of two new oligoglycoside sulfates: Pectinioside C and Pectinioside D. *Liebigs Ann. Chem.* 495 (1988).
109. M. Iorizzi, L. Minale, R. Riccio and T. Yasumoto. Isolation of fifteen sterol constituents (six glycosides and nine polyhydroxysteroids) from the starfish *Solaster borealis*. *J. Nat. Prod.* **55**, 866 (1992).
110. J. A. Dale, H. S. Mosher. Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastomeric mandelate, methylmandelate and α -methoxy- α -trifluoromethylacetate (MTPA) esters. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 512 (1973).
111. S. S. Oh, W. M. Butler, M. Koreeda. Nonempirical confirmations of the absolute configuration of (+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid. *J. Org. Chem.* **54**, 4499 (1989).
112. M. Iorizzi, R. De Riccardis, L. Minale, E. Palagiano, R. Riccio, C. Debitus and D. Duhet. Polyosygenated marine steroids from the deep water starfish *Styracaster caroli*. *J. Nat. Prod.* **57**, 10, 1361 (1994).

113. M. V. D'Auria, R. Riccio, L. Minale, S. La Barre and J. Pusset. Novel marine steroid sulfates from Pacific ophiuroids. *J. Org. Chem.* **52**, 18, 3947 (1987).
114. M. S. Maier, A. M. Seldes and E. G. Gros. ¹H NMR and molecular studies of epimeric ethyl esters of 20 (R,S)-hidroxy-23-norcholanoic acids. *Magn. Reson. Chem.* **29**, 137 (1991).
115. W. R. Nes, T. E. Varkey and K. Krevitz. The stereochemistry of sterols at C-20 and its biosynthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 260 (1977).
116. D. J. Vanderah and C. Djerassi. Marine natural products, synthesis of four occurring 20 β -H cholanic acid derivatives. *J. Org. Chem.* **43**, 7, 1442 (1978).
117. N. Y. Kalinovskaya, T. A. Kuznetsova and G. B. Elyakov. Sterol composition of Pacific holothurian *Stichopus japonicus* Selenka. *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**, 597 (1983).
118. I. Rubinstein, L. J. Goad, A. D. H. Clague and L. J. Mulheirn. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochem.* **15**, 195-200 (1976).
119. T. Itoh, D. Sica and C. Djerassi. Minor and trace sterols in marine invertebrates. Isolation and structure elucidation of seventy four sterols from the sponge *Axinella cannabina*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 147 (1983).
120. L. J. Goad, F. X. Garneau, J. L. Simard, J. W. ApSimon and M. Girard. Composition of the free, esterified and sulfated sterols of the sea cucumber *Psolus fabricii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**, 189 (1986).
121. K. Ambia, L. J. Goad, S. Hkycko, F. X. Garneau, J. L. Simard, J. Belanger and J. W. ApSimon. The sterols of the sea cucumber *Psolus phantapus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **86B**, 191 (1987).
122. T. Komori, H. Nanri, Y. Itakura, K. Sakamoto, S. Taguchi, R. Higuchi, T. Kawasaki and T. Higuchi. Structures of two newly characterized genuine sapogenins and an oligoglycoside sulfate. *Liebig. Ann. Chem.* **37** (1983).

123. G. J. Gerwig, J. P. Kamerling and J. F. Vliegenthart. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high resolution capillary G. L. C.. *Carbohydr. Res.* **62**, 349 (1978).
124. K. Leontein, B. Lindberg and J. Lönngren. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. *Carbohydr. Res.* **62**, 359 (1978).
125. Oshima, Ruyichi, J. Kumanotani and C. Watanabe. Gas liquid chromatographic resolution of sugar enantiomers as diastereoisomeric methylbenzylaminoalditols. *J. Chrom.* **259**, 159 (1983).
126. M. R. Cases, "Estudio del sistema de polisacáridos del alga roja calcárea *Corallina officinalis*". Tesis de doctorado, Univ. de Buenos Aires, 1995.
127. M. R. Cases, A. S. Cerezo and C. A. Stortz. Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-O-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxypropylamino) alditols. *Carbohydr. Res.* **269**, 333 (1995).
128. R. Thomson, "Naturally occurring quinones". Academic Press, New York, 257 (1971).
129. L. J. Goad and N. W. Withers. Identification of 27-Nor-(24R)-24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol and brassicasterol as the major sterols of the marine dinoflagellate *Gymnodinium simplex*. *Lipids* **17**, 853 (1982).
130. P. A. Voogt. Sterols of some echinoids. *Arch Int. Physiol. Biochim.* **80**, 883 (1972).
131. A. G Smith and L. J. Goad. Sterol biosynthesis by the sea urchin *Echinus esculentus*. *Biochem. J.* **142**, 421 (1974).
132. S. Yasuda. Sterol compositions of echinoids (sea urchin, sand dollar and heart urchin). *Comp. Biochem. Physiol. B* **49**, 361 (1974).

133. M. Kobayashi and H. Mitsuhashi. Marine sterols VI. Sterols of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Steroids* **26**, 605-624 (1975).
134. N. Withers, in: "Marine Natural Products" P. J. Scheuer, Academic Press, N.Y., vol 5, chapter 3 (1983).
135. M. V. D'Auria, R. Riccio, L. Minale, S. La Barre and J. Pusset. Novel marine steroid sulfates from pacific ophiuroids. *J. Org. Chem.* **52**, 3947 (1987).
136. J. W Blunt and J. B. Stothers. ^{13}C NMR Spectra of Steroids, a survey and commentary. *Org. Magn. Reson.* **9**, 439 (1977).
137. W. Arnolds, W. Meister and G. Englert. Substituent increments for the ^1H -NMR. Chemical shifts of the 18- and 19-methyl protons of steroids. *Helv. Chim. Acta* **57**, 1559 (1974).
138. S. N. Fedorov, E. V. Levina, A. Y. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok and V. A. Stonik. Sulfated steroids from pacific brittle stars *Ophiopholis aculeata*, *Ophiura sarsi* and *Stegophiura brachiactis*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1631 (1994).
139. M. V. D' Auria, L. Gómez Paloma, L. Minale, R. Riccio and A. Zampella. On the composition of sulfated polyhydroxysteroids in some ophiuroids and the structure determination of six new constituents. *J. Nat. Prod.* **58**, 189 (1995).
140. R. Riccio, M. V. D' Auria and L. Minale. Unusual sulfated marine steroids from the ophiuroid *Ophioderma longicaudum*. *Tetrahedron* **41**, 24, 6041 (1985).
141. E. M. Dobrusin and D. W. Fry. Protein tyrosine kinases and cancer. *Ann. Rep. Med. Chem.* **27**, 169 (1992).
142. T. R. Burke. Protein-tyrosine kinases: potential targets for anticancer drug development. *Stem Cells* (Dayton) **12** (1) 1-6 (1994).
143. M. H. Kreuter, R. E. Leake, F. Rinaldi, W. Mueller-Klieser, A. Maidohf, W. E. G. Muller and H. C. Schroder. Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the

- marine sponge metabolite (+)-aerophysinin-1. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 151 (1990).
144. K. A. Alvi, M. C. Diaz, P. Crews, D. L. Slate, R. H. Lee and R. Moretti. Evaluation of new sesquiterpene quinones from two *Dysidea* sponge species as inhibitors of protein tyrosine kinase. *J. Org. Chem.* **57**, 6604 (1992).
145. K. A. Alvi, J. Rodriguez, M. C. Diaz, R. Moretti, R. S. Wilhelm, R. H. Lee, D. L. Slate and P. Crews. Protein tyrosine kinase inhibitory properties of planar polycyclics obtained from the marine sponge *Xestospongia cf. carbonaria* and from total synthesis. *J. Org. Chem* **58**, 4871 (1993).
146. R. H. Lee, D. L. Slate, R. Moretti, K. A. Alvi and P. Crews. Marine sponge polyketide inhibitors of protein tyrosine kinase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **184**, 765 (1992).
147. T. C. Mckee, J. H. Cardellina, R. Riccio, M. V. D' Auria, M. Iorizzi, L. Minale, R. A. Moran, R. J. Gulakowski, J. B. McMahon, R. W. Buckheit, K. M. Snader and M. R. Boyd. HIV - Inhibitory natural products. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem.* **37**, 6, 793-197 (1994).
148. F. De Riccardis, L. Minale, R. Riccio, B. Giovannitti, M. Iorizzi and C. Debitus. Phosphated and sulphated marine polyhydroxylated steroids from the starfish *Tremaster novaecaledoniae*. *Gazzetta Chimica Italiana*, **123**, 79 (1993).
149. M. V. D' Auria, L. Gomez Paloma, L. Minale, R. Riccio, A. Zampella and M. Morbidoni. Isolation and structure characterization of two novel bioactive sulphated polyhydroxysteroids from the antarctic ophiuroid *Ophiosparte gigas*. *Nat. Prod. Lett.* **3**, 197 (1993).
150. J. A. Findlay, Z. Q. He and L. A. Calhoun. Forbesin: A novel sulfated glycolipid from the starfish *Asterias forbesi*. *J. Nat. Prod.* **53**, 4, 1015 (1990).

151. J. A. Findlay, N. Yayli and L. A. Calhoun. Novel sulfated hydrocarbons from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *J. Nat. Prod.* **54**, 1, 302 (1991).
152. Y. Nakao, S. Matsunaga and N. Fusetani. Toxadocial A: A novel Thrombin inhibitor from the marine sponge *Toxadocia cylindrica*. *Tetrahedron Lett.* **34**, 1511 (1993).
153. Y. Nakao, S. Matsunaga and N. Fusetani. Toxadocials B, C and Toxadocic acid A: Thrombin-inhibitory aliphatic tetrasulfates from the marine sponge, *Toxadocia cylindrica*. *Tetrahedron* **49**, 48, 11183 (1993).
154. A. Crispino, A. De Giulio, S. De Rosa, S. De Stefano, A. Milone and N. Zavodnik. A sulfated normonoterpenoid from the ascidian *Polycitor adriaticus*. *J. Nat. Prod.* **57**, 11, 1575 (1994).
155. S. Tsukamoto, H. Kato, H. Hirota and N. Fusetani. Antibacterial and antifungal sulfated alkane and alkenes from the hepatopancreas of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *J. Nat. Prod.* **57**, 11, 1606 (1994).
156. E. Breitmaier and W. Voelter. "Carbon-13 NMR Spectroscopy". Weinheim, New York VCH, 1987.
157. J. Su, Y. Zhong and L. Zeng. Four novel diterpenoids: Clavirolides B, C and E form the chinese soft coral *Clavularia viridis*. *J. Nat. Prod.* **54**, 2, 380-385 (1991).
158. P. Albersheim, D. J. Nevins, P. D. English and A. Karr. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**, 340 (1967).
159. H. Eggert, C. L. Van Antwerp, N. S. Bhacca, C. J. Djerassi. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of hidroxy steroids. *J. Org. Chem.* **41**, 21 (1976).

160. C. L. Van Antwerp, H. Eggert, G. D. Meakins, J. O. Miners and C. Djerassi. Additivity relationships in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of dihydroxy steroids. *J. Org. Chem.* **42**, 789 (1977).
161. J. A. Findlay, M. Jaseja, D. J. Burnell, and J. R. Brisson. Major saponins from the starfish *Asterias forbesi*. Complete structures by nuclear magnetic resonance methods. *Can. J. Chem.*, **65**, 1386 (1987).

**RESUMEN: AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS
SECUNDARIOS POLARES PRESENTES EN EQUINODERMOS**

El *phylum Echinodermata* comprende 6000 especies vivientes distribuídas en todos los océanos desde los trópicos hasta la Antártida. Se divide en 5 clases: *Crinoidea* (lirios de mar); *Holothuroidea* (pepinos de mar u holoturias); *Echinoidea* (erizos de mar y dólares de arena); *Asteroidea* (estrellas de mar) y *Ophiuroidea* (ofiuros).

Este trabajo de tesis tuvo por objetivo el aislamiento y la elucidación estructural de metabolitos secundarios de organismos pertenecientes a tres clases del *phylum Echinodermata*. En ese sentido se realizó el estudio de los asteroideos *Cosmasterias lurida* (Philippi, 1858) y *Luidia ludwigi scotti* Bell (1917), los ofiuroideos *Ophioplocus januarii* (Lütken, 1856), *Ophionotus victoriae* (Bell, 1902), *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875), *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816) y el equinoideo *Encope emarginata* (Leske, 1778).

PHYLUM ECHINODERMATA - CLASE ASTEROIDEA

a) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SAPONINAS Y OTROS

ESTEROIDES POLARES DE *Cosmasterias lurida*

Se aislaron y caracterizaron dos glicósidos esteroidales (**Luridósidos A y B**) y cuatro asterosaponinas (**Cosmasterósidos A, B, C, y D**), todos ellos de **estructura novedosa**. Se aislaron también el Pycnopodiósido C, Ophidianósido F y Forbésido H informados con anterioridad en *Pycnopodia helianthoides*, *Ophidiaster ophidianus* y *Asterias forbesi*, respectivamente.

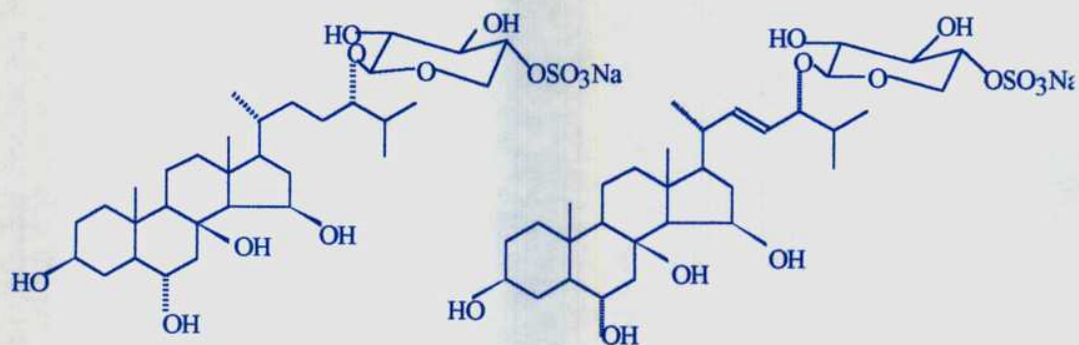


Fig. 1 - Luridósidos A y B

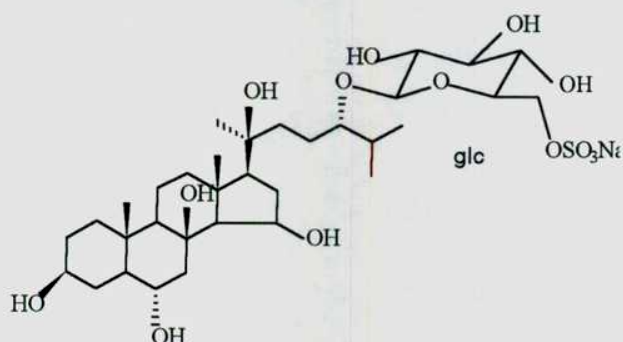
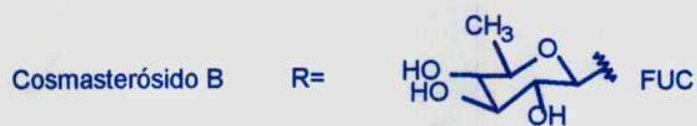
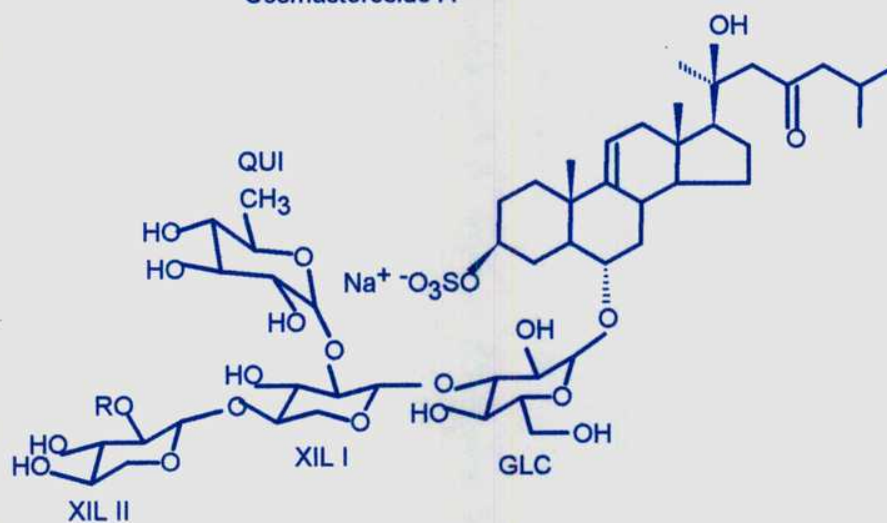
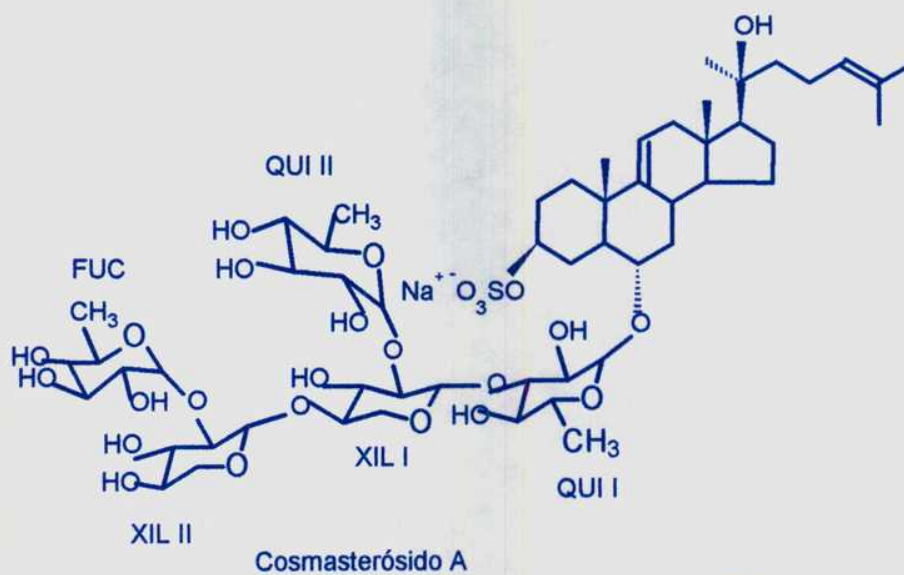
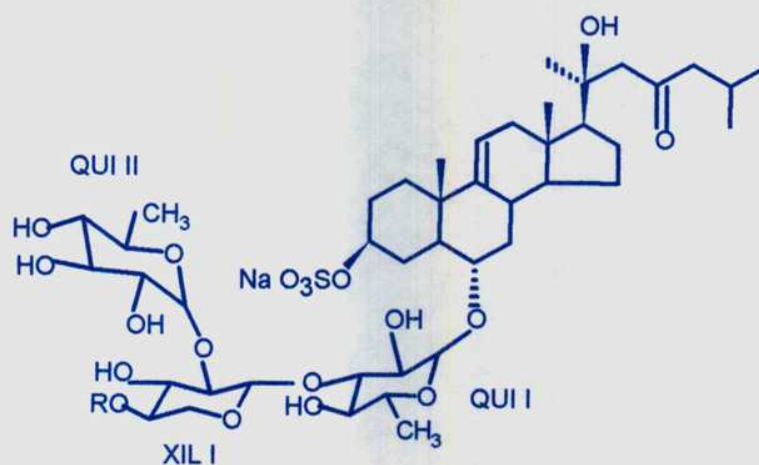


Fig. 2 - Pycnopodiósido C

El Cosmasterósido A contiene la misma cadena de oligosacárido que el Ophidianósido F con la aglicona (20S)-5 α -colesta-9(11), 24-dieno-3 β ,6 α ,20-triol 3 β -sulfato. Los Cosmasterósidos B, C y D contienen Thornasterol A como aglicona y difieren en el número e identidad de los monosacáridos de la cadena de azúcares. El Cosmasterósido B contiene una cadena de oligosacáridos novedosa que difiere de la del Ophidianósido F en el reemplazo de la unidad de quinovosa unida a C-6 de la aglicona por glucosa. Los tetrasacáridos Cosmasterósidos C y D están relacionados con el Cosmasterósido B y el Ophidianósido F respectivamente por la pérdida de la fucosa terminal.

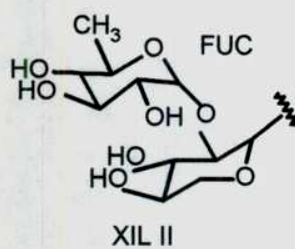
Estos compuestos junto con los Luridósidos A y B (novedosos) y el Pycnopodiósido C completan las saponinas aisladas de esta estrella.





Ophidianósido F

R =



Cosmasterósido C

R =



Forbésido H

R = H

Fig. 3 - Glicósidos esteroidales aislados de *Cosmasterias lurida*

b) AISLAMIENTO DE SAPONINAS Y ESTEROIDES POLIOXIGENADOS DE Luidia ludwigi scotti Bell (1917)

El asteroideo *Luidia ludwigi scotti* Bell (1917) fue recolectado en la Bahía de San Antonio Oeste, provincia de Río Negro en agosto de 1993. El procedimiento de purificación fue similar al utilizado con *Cosmasterias lurida*. Se aislaron de esta estrella dos asterosaponinas, los Acanthaglicósidos B (10,5 mg) y C (24,0 mg), aislados previamente de la estrella *Acanthaster planci* y tres esteroides polihidroxilados. Dos de ellos, 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,16 β ,26-hexaol (18,9 mg) y 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 15-sulfato (47,0 mg), fueron previamente aislados de las estrellas *Myxoderma platyacanthum* y *Luidia maculata*, respectivamente, mientras que 5 α -colest-3 β ,5,6 β ,15 α ,26-pentol 26-sulfato (9,7 mg) resultó **novedoso**.

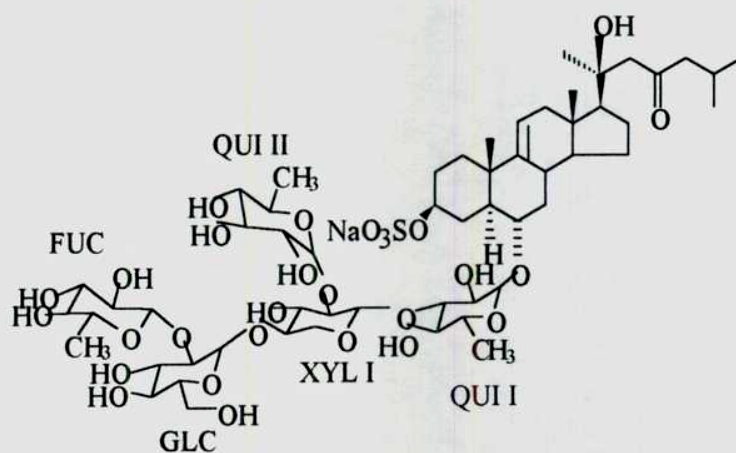
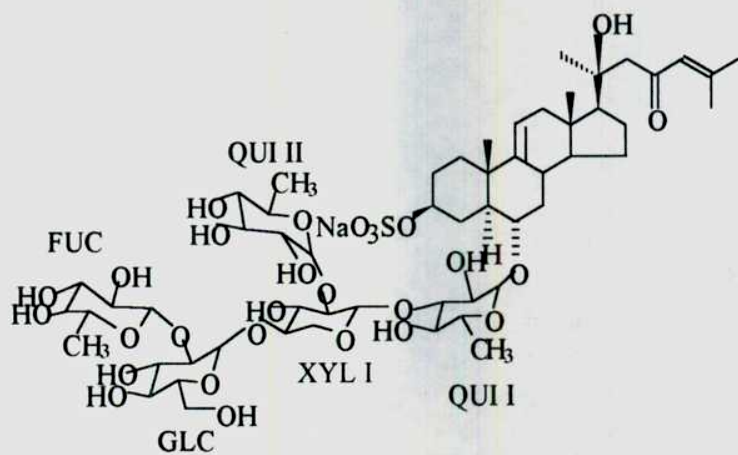
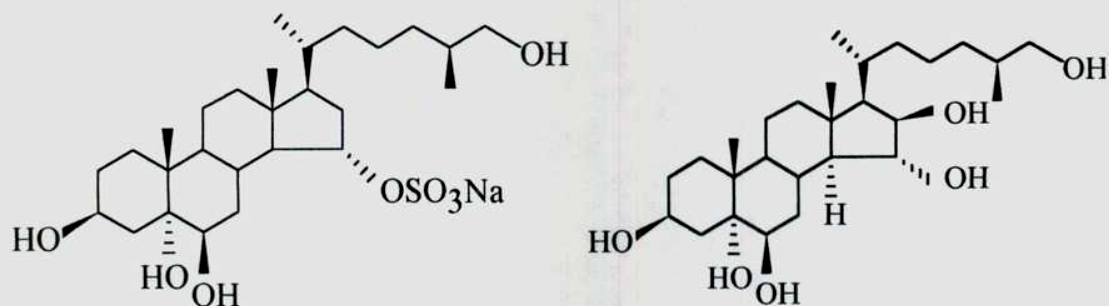


Fig. 4 - Acanthaglicósidos B y C

Fig. 5 - Esteroides polihidroxilados de *Luidia ludwigi*

La presencia de una función hidroxilo en C-26 es común en esteroides polihidroxiados aislados de estrellas. Sin embargo un grupo sulfato en esa posición es muy poco usual.

La configuración 25S en los tres esteroides polihidroxiados se estableció sobre la base del análisis de los espectros de RMN ^1H de sus ésteres con los ácidos (+)-(R)- y (-)-(S)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético (MTPA, reactivo de Mosher).



Fig. 6 - compuesto novedoso aislado de *Luidia ludwigi*.

PHYLUM ECHINODERMATA - CLASE OPHIUROIDEA

La búsqueda de metabolitos secundarios en asteroideos (estrellas) y en holoturoideos (pepinos de mar) recibió marcada atención en los últimos años. Por el contrario, son muy pocos los trabajos publicados sobre el aislamiento de esteroides polihidroxiados sulfatados de ofiuros.

En contraste con la hidroxilación en C-26 común en los esteroides polihidroxiados de estrellas, los esteroides polares de ofiuros se caracterizan por la hidroxilación y sulfatación en C-3 α y en C-21. Esteroides sulfatados en esta última posición sólo fueron encontrados en la estrella *Euretaster insignis*. Otras características distintivas de los esteroides polares de ofiuros son la

hidroxilación en C-11 y C-12 y la fusión *cis* de los anillos A/B o la presencia de un doble enlace Δ^5 .

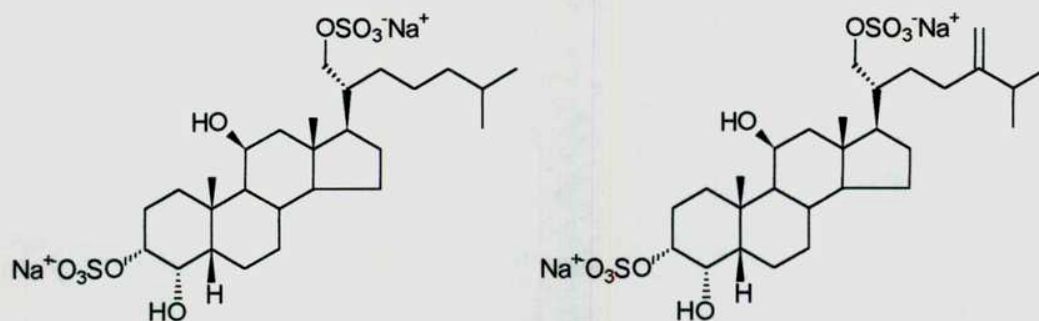
ESTEROIDES POLIHIDROXILADOS SULFATADOS DE

Ophioplocus januarii (Lütken 1856)

Los cuatro esteroides polares aislados de *Ophioplocus januarii* presentan grupos sulfato en C-3 α y C-21, los anillos A/B fusionados en *cis*, y grupos hidroxilos en los carbonos C-4 α y C-11 β . El esteroide 24-norcolest-(22E)-5 β -22-en-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetraol 3,21-disulfato resultó **novedoso (fig. 7)**. Los otros tres esteroides fueron aislados previamente de los ofiuros *Ophiocoma dentata*, *Ophiarthrum elegans* y *Ophiarachna incrassata*.



Fig. 7 - Compuesto novedoso de *Ophioplocus januarii*



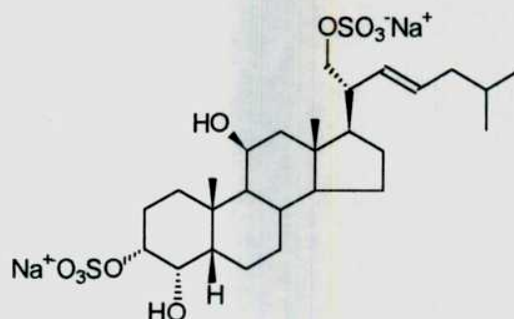


Fig. 8 - Compuestos aislados de *Ophioplocus januarii*

Actividad antiviral de los compuestos aislados de *Ophioplocus januarii*

Se estudió la actividad antiviral de los compuestos aislados de *Ophioplocus januarii* contra cuatro virus patógenos en humanos: virus del Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus Junin (JV), virus sincitial respiratorio (RSV) y virus del polio (PV).

Dado que los compuestos aislados de *Ophioplocus januarii* difieren sólo en la cadena lateral, los resultados obtenidos en estos ensayos indican la importancia del doble enlace Δ^{22} , presente en dos de ellos, en el efecto inhibitorio del virus sincitial respiratorio (RSV), así como del doble enlace $\Delta^{24(28)}$ en la replicación del virus Junín (JV).

ESTEROIDES POLIHIDROXILADOS SULFATADOS DE

Ophionotus victoriae (Bell, 1902)

El ofiuroideo *Ophionotus victoriae* (Bell 1902) (0,6 kg) fue colectado en 1994 en Caleta Potter, muy cerca de la Base Jubany, Islas Shetland del Sur, Antártida. De los cuatro compuestos aislados, dos fueron descriptos previamente a partir de los extractos de *Ophiotrix fragialis* y *Ophiura texturata* el

primero y *Ophiura sarsi*, *Ophiotrix fragialis* y *Ophiura texturata*, el segundo. Los compuestos **novedosos** se obtuvieron como una mezcla de isómeros.

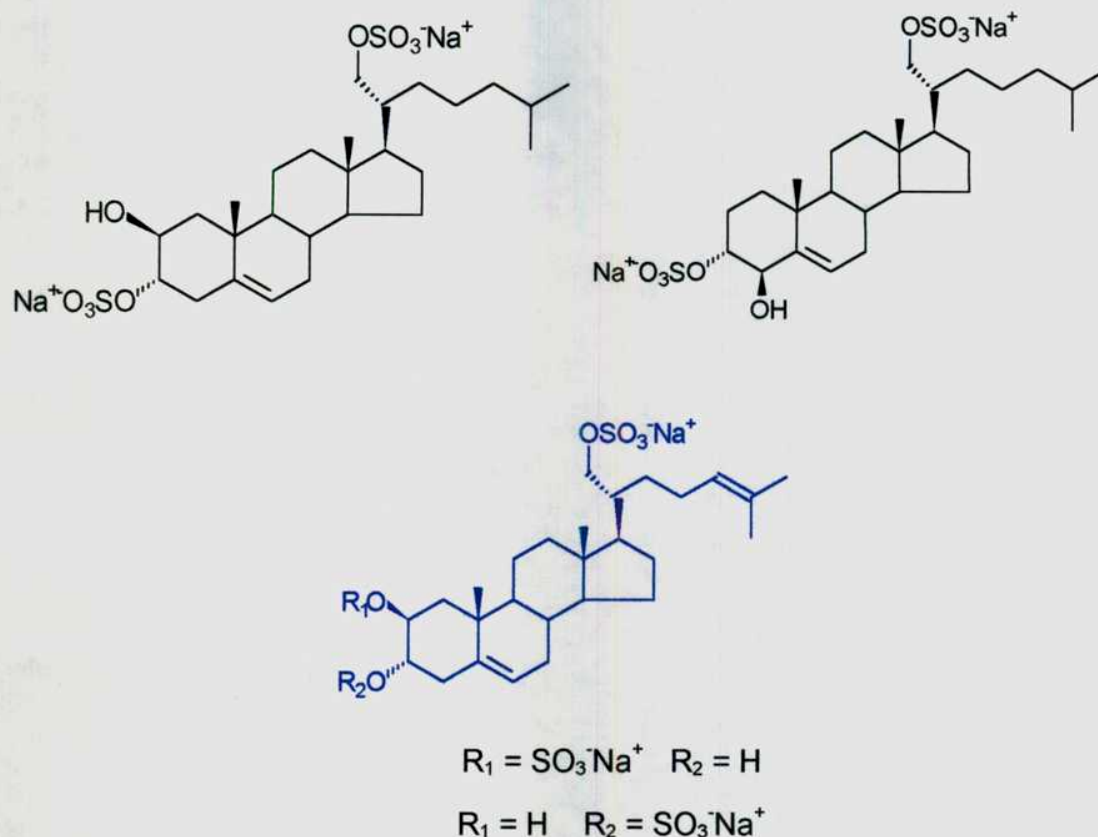


Fig. 9 - Compuestos aislados de *Ophionotus victoriae*.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POLARES DE *Ophiocoma echinata* (Lamarck, 1816)

El ofiuro tropical *Ophiocoma echinata* fue recolectado en la bahía de Neguange, Colombia. De este organismo se aislaron dos esteroides polihidroxilados sulfatados 5 β ,colest-3 α ,4 α ,11 β ,12 β ,21-pentol 3,21-disulfato y 5 β ,colest-3 α ,4 α ,11 β ,21-tetraol 3,21-disulfato aislados previamente de

Ophioderma longicaudum y *Ophiocoma dentata*, respectivamente. Este último también fue encontrado en *Ophioplocus januarii* en este trabajo.

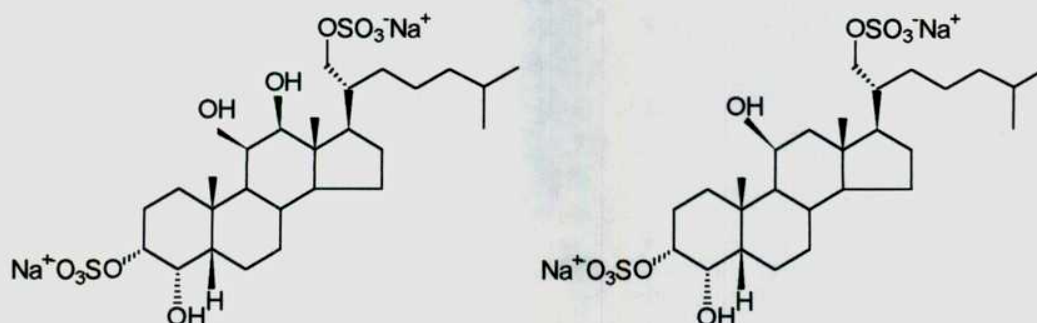


Fig. 10 - Esteroides aislados de *Ophiocoma echinata*

UN ALQUENO SULFATADO NOVEDOSO DE *Ophiocoma echinata*

El estudio de las fracciones de CLAR de *Ophiocoma echinata* permitió aislar un alqueno sulfatado. La estructura fue determinada por espectrometría de masa (FAB) y RMN 1D de ^1H y ^{13}C y secuencias bidimensionales COSY ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C y NOESY. No existen antecedentes en literatura respecto del aislamiento de este tipo de compuestos en ofiuros

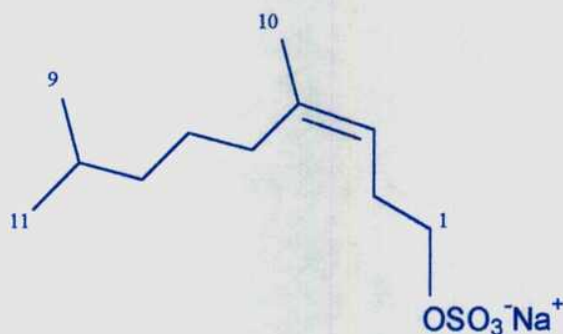


Fig. 11 - Alqueno sulfatado aislado de *Ophiocoma echinata*

ESTEROIDES SULFATADOS NOVEDOSOS DE *Astrotoma agassizii*

El ofiuro antártico *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875) se colectó cerca de las Islas Georgias del Sur en febrero de 1994. La presencia del grupo sulfato en C-2 es una característica poco común en los esteroides polares aislados de ofiuros. Además, los compuestos novedosos presentan un grupo isopropenilo en la cadena lateral y constituyen los primeros ejemplos de esta cadena en ofiuros. Los dos compuestos conocidos fueron aislados previamente del ofiuro antártico *Ophiosparte gigas*.

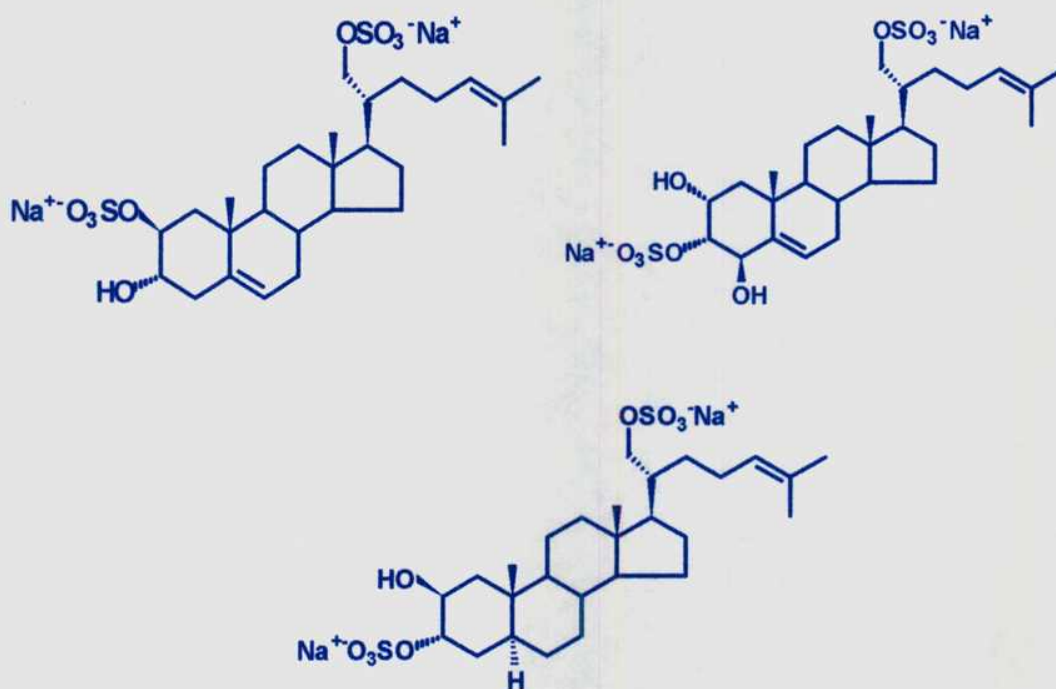


Fig. 12 - Compuestos novedosos aislados de *Astrotoma agassizii*.

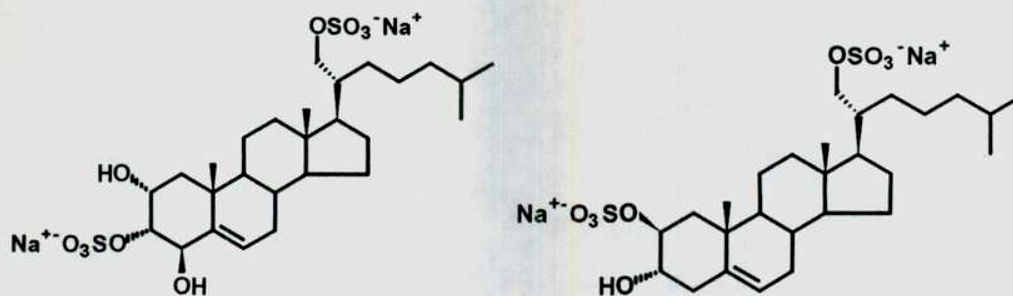


Fig. 13 - Otros esteroides de *Astrotoma agassizii*.

ESTEROLES MARINOS

En este trabajo de Tesis se estudió además el contenido de esteroides de la estrella *Luidia ludwigi scotti* Bell (1917), del ofiuero *Astrotoma agassizii* (Lyman, 1875) y del equinoideo *Encope emarginata* (Leske, 1778). En pepinos y estrellas de mar predominan los esteroides Δ^7 , mientras que en erizos, dólares de arena y ofiueros son mayoritarios los esteroides Δ^5 .



